

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
ODDZIAŁ MEDYCZYNY LABORATORYJNEJ

STUDIA JEDNOLITE MAGISTERSKIE

KIERUNEK: Analityka medyczna

AGNIESZKA SOBCZAK

NR ALBUMU: 100194

**"WALIDACJA SYSTEMU QUANTIFILER DUO DO OZNACZANIA
AMPLIFIKOWALNEGO SPECYFICZNE LUDZKIEGO DNA
W PRÓBACH GENETYCZNO - SĄDOWYCH."**

"VALIDATION OF QUANTIFILER DUO SYSTEM TO QUANTIFICATION
OF AMPLIFIABLE HUMAN SPECIFIC DNA
IN FORENSIC GENETICS SAMPLES."

Praca magisterska napisana pod kierunkiem naukowym:

dr hab. n. med. Renaty Jacewicz

Pracownia Genetyki Medycznej i Sądowej

Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Łódź, 2015

*Podziękowanie za pomoc i okazane wsparcie
dla dr hab. n. med. Renaty Jacewicz
oraz dr n. med. Macieja Jędrzejczyka*

Spis treści

I. Wstęp	5
1. Genetyczny dowód w badaniach identyfikacyjnych.	5
2. Etapy analizy genetyczno – sądowej.	7
3. Ograniczenia w profilowaniu DNA.	9
4. Analiza ilościowa i jakościowa DNA.	11
4.1. Nieselektywne metody pomiaru stężenia DNA.	11
4.2. Selektywne metody analizy stężeń oraz oceny jakościowej DNA.	12
5. Walidacja w laboratoriach genetyczno-sądowych.	15
II. Cel pracy	18
III. Materiał i metodyka badań	19
1. Materiał	19
2. Metodyka badań.	20
2.1. Wykonanie reakcji amplifikacji.	20
2.2. Sporządzenie krzywej standardowej.	21
2.3. Ocena precyzji metody.	23
2.4. Oznaczenia prób o charakterze dowodowym.	24
2.5. Porównanie oznaczeń uzyskanych metodą real – time PCR z innymi technikami pomiarowymi.	24
2.5.1. Porównanie pomiarów stężeń prób kontrolnych.	24
2.5.2. Porównanie oznaczeń stężenia DNA z pomiarami fluorymetrycznymi.	25
2.5.3. Określenie zależności między ilością DNA użytą w reakcji PCR a średnią wartością RFU.	25
IV. Wyniki i omówienie	27
V. Dyskusja.	44

VI. Wnioski.....	49
VII. Streszczenie	50
VIII. Piśmiennictwo	51
IX. Spis rycin	57
X. Spis tabel.....	59
XI. Wykaz skrótów wykorzystanych w pracy.....	60
XII. Załączniki	62
Załącznik nr 1. Karta pomiarów standardu z zestawu Quantifiler Duo DNA Quantification Kit oraz jego rozcieńczeń.....	62
Załącznik nr 2. Karta pomiarów ludzkiego i męskiego DNA dla prób o charakterze dowodowym.....	63
Załącznik nr 3. Karta pomiarów materiałów kontrolnych w procedurze walidacyjnej Quantifiler Duo DNA Quantification Kit.	65
Załącznik nr 4. Karta pomiarów do oceny zależności średniej wartości RFU względem wsadowej ilości DNA do reakcji PCR.....	66

I. Wstęp

1. Genetyczny dowód w badaniach identyfikacyjnych.

Wprowadzenie analizy genetycznej to największy sukces w obszarze nauk medyczo – sądowych, który dokonał się na przestrzeni ostatnich dwudziestu lat minionego stulecia. Stanowi ona obecnie najskuteczniejsze narzędzie w egzekwowaniu prawa [31].

Poza rozwiązywaniem problemów w aspekcie kryminalistycznym analizy genetyczne stosowane są do identyfikacji zwłok i szczątków ludzkich pochodzących z katastrof masowych, ustalenia tożsamości osób zaginionych. W sprawach alimentacyjnych stanowią rozstrzygający wynik w przypadku spornego ojcostwa, a w sprawach spadkowych czy imigracyjnych pozwalają ustalić stopień pokrewieństwa bądź je wykluczyć.

Ciągle poszerzanemu spektrum badań genetyczno – sądowych towarzyszy rozwój metod badawczych bazujących na zaawansowanych technikach z zakresu biologii molekularnej. Rozwój ten nie byłby możliwy bez łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction – PCR) opracowanej przez Kary Mullisa, która obecnie stanowi podstawę metod stosowanych w badaniach genetycznych [37]. Wzrastająca czułość oznaczeń umożliwia przeprowadzenie identyfikacji osobniczej na podstawie kilku, a w szczególnych sytuacjach nawet jednej diploidalnej komórki ludzkiej, która zawiera 6 pg DNA, co sprawia, że pojęcie zbrodni doskonałej w obecnych czasach nie istnieje [57].

Początki analiz genetycznych dla celów sądowych wiązały się z badaniem polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. Restriction Fragments Length Polymorphism – RFLP) sekwencji powtórzonych 9 – 100 par zasad określanych mianem zmiennej liczby tandemowych powtórzeń (ang. Variable Number of Tandem Repeats – VNTR). Ich odkrycie w roku 1985 zawdzięczamy Jeffreysowi i wsp. [27]. W sądzie typowanie VNTR zostało wykorzystane po raz pierwszy w roku 1986 jako dowód w sprawie dotyczącej gwałtu i zabójstwa dwóch dziewczynek. Była to zarazem

pierwsza sprawa, w której dzięki wykorzystaniu analizy DNA ujęto sprawcę oraz oczyszczono z zarzutów podejrzanego [49].

Od wczesnych lat 90 – tych w badaniach identyfikacyjnych wykorzystywane są krótkie sekwencje tandemowych powtórzeń (ang. Short Tandem Repeats – STR), nazywane także mikrosatelitarnymi. Po raz pierwszy zostały one opisane przez Edwardsa i wsp. [18]. Motyw repetytywny stanowi tu 2 – 6 nukleotydów powtarzających się w określonym miejscu genomu – locus średnio od kilku do kilkunastu razy tworząc cząsteczki w granicach 100 – 450 par zasad [11,48].

Analiza autosomalnych markerów STR stanowi obecnie standard zarówno w identyfikacji osobniczej, jak i w analizie pokrewieństwa ze względu na dobrze poznany mechanizm ich dziedziczenia [22]. Analiza markerów STR jest także korzystna ze względu na ich stosunkowo regularną, powtarzalną sekwencję, niewielkie rozmiary cząsteczki oraz efektywny proces amplifikacji, przy zastosowaniu reakcji typu multiplex – PCR [45,54].

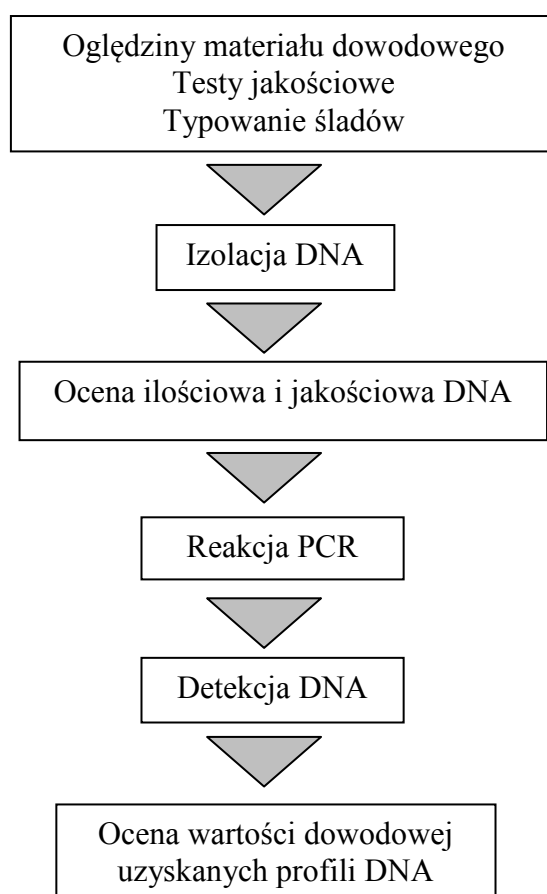
Niezagrożona pozycja markerów STR w badaniach z zakresu genetyki medyczo – sądowej jest związana także z rozbudowanym systemem baz danych na świecie opracowanych w oparciu właśnie o te markery. Tworzenie baz danych zostało zapoczątkowane w 1994 roku w Stanach Zjednoczonych przez FBI (ang. Federal Bureau of Investigation). Powstał wtedy system „CODIS” (ang. Combined DNA Index System), który pozwala na gromadzenie i porównywanie profili DNA. Wkrótce potem, w roku 1995 Forensic Science Service w Wielkiej Brytanii utworzyło własną bazę danych, która obecnie jest największą na świecie. Według raportu opublikowanego w grudniu 2014 roku, w brytyjskiej bazie znajduje się 5 716 085 profili DNA [39]. W kolejnych latach bazy danych powstały w takich krajach jak Holandia, Austria i Niemcy. Od 2007 roku również w Polsce funkcjonuje policyjna baza danych „Genom” [7,42,48].

W celu zapewnienia kompatybilności danych, możliwości ich wymiany i porównywania narodowe bazy danych STR opierają się o zakresy ENFSI lub CODIS. Istnieje wspólny rdzeń 7 loci STR dla wszystkich narodowych baz danych,

są tzw. loci ENFSI: D3S1358, vWA, D8S1179, D21S11, D18S51, TH01 i FGA [17]. System CODIS obejmuje 13 loci, w których skład wchodzi 7 loci ENFSI oraz 6 dodatkowych: CSF1PO, D5S818, D7S820, D13S317, TPOX oraz D16S539 [43].

2. Etapy analizy genetyczno – sądowej.

Standardowa identyfikacja z zastosowaniem markerów STR opiera się na pobraniu materiału, izolacji DNA, ocenie uzyskanego DNA, reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) i detekcji produktów amplifikacji. Etapy analizy, które prowadzą do uzyskania profilu STR zostały przedstawione na Rycinie 1.



Rycina 1. Etapy genetyczno – sądowej analizy materiału prowadzącej do uzyskania specyficznego osobniczo profilu DNA.

Opracowanie własne na podstawie Applied Biosystems. AmpF ℓ STR ® NGM ™ PCR Amplification Kit. User guide. USA, 2015, 4425511 Rev. G: 15

Uzyskanie profilu STR z materiału dowodowego jest możliwe dzięki multipleksowej reakcji PCR. Po raz pierwszy została ona zastosowana w 1988 roku [12]. Jednoczesne powielenie wielu regionów matrycowego DNA stało się możliwe dzięki wykorzystaniu wielu par starterów znakowanych różnymi fluorochromami, co dało możliwość jednoczesnej detekcji markerów o tym samym zakresie wielkości [7,56].

Zastosowanie multipleksowych zestawów STR pozwala na ograniczenie do minimum ilości matrycowego DNA izolowanego zaledwie z kilkudziesięciu, a nawet kilku komórek. Ma to istotne znaczenie w analizie genetyczno – sądowej, w której dysponuje się często śladową ilością DNA. Dodatkowym atutem równoczesnego powielenia wielu loci jest znaczne skrócenie czasu i kosztów analizy przy istotnym wzroście jej wartości dowodowej [45,54].

Rozdział powielonych fragmentów DNA może odbywać się z zastosowaniem techniki elektroforezy kapilarnej. Cząsteczki DNA naładowane ujemnym ładunkiem elektrycznym migrują w kierunku elektrody o dodatnim ładunku w cienkich kwarcowych rurkach. Migrujące DNA poddawane jest działaniu światła lasera i kamery CCD (ang. Charge Coupled Device). Laser emitując promieniowanie powoduje wzbudzenie barwników fluorescencyjnych, którymi są wyznakowane primery, natomiast kamera CCD odczytuje emisję fluorescencji fali światła o określonej długości, która występuje każdorazowo, gdy w okienku detekcji pojawi się allel. O detekcji decyduje sygnał fluorescencji powyżej minimalnego sygnału różnicującego MDS (ang. Minimum Distinguishable Signal). Jest to sygnał produktu przedstawiony w formie piku, który odróżniany jest od szumów. Intensywność świecenia barwników fluorescencyjnych zależy od ilości produktów amplifikacji i mierzona jest za pomocą względnej jednostki fluorescencji – RFU (ang. Relative Fluorescence Unit) [9]. Detekcji podlegają też fragmenty DNA o znanej długości pełniące rolę wzorca wyznakowanego odmiennym barwnikiem fluorescencyjnym. Po zebraniu przez detektor sygnałów następuje analiza komputerowa. Symbole liczbowe przypisywane są poszczególnym produktom PCR i odpowiadają liczbie jednostek repetytywnych, które obecne są w namnożonym fragmencie. Poprzez porównanie do wzorca oraz drabiny allelicznej o znanych wariantach powtarzalnych dokonuje się

pomiaru długości i ilości tandemowych powtórzeń wszystkich alleli charakterystycznych dla badanego profilu genetycznego. Elektroforeza kapilarna wykazuje wysoką precyzję analizy, co daje możliwość detekcji fragmentów DNA różniących się jedną parą zasad [7,54].

3. Ograniczenia w profilowaniu DNA.

W praktyce badawczej z zakresu genetyki sądowej spotykamy się z takimi ograniczeniami jak: obecność inhibitorów, kontaminacja, degradacja czy też mieszaniny DNA. Czynniki te mogą spowodować w procesie profilowania DNA wystąpienie zjawiska nadmiernej amplifikacji jednego z alleli w locus heterozygotycznym (amplifikacja preferencyjna), wypadnięcie allelu (ang. drop – out), wstawienie przypadkowego allelu (ang. drop – in), wzrost poziomu stutterów odczytywanych jako fałszywe allele. W wyniku tego procedura profilowania może zakończyć się uzyskaniem częściowego bądź nieprawidłowego profilu DNA, brakiem możliwości jego poprawnej interpretacji, a nawet niemożnością jego odczytu [13].

Inhibicja reakcji PCR jest najczęstszą przyczyną niepowodzeń profilowania DNA. Jest to dość powszechne zjawisko w praktyce genetyczno – sądowej. Przykładami inhibitorów są substancje pochodzenia zewnętrznego jak i wewnętrznego, np.: tanina (inhibitor polimerazy Taq), sole kwasów żółciowych, kwasy humusowe, hematyna i melanina (hamują przyłączenie DNA), kolagen, izotiocyjanian guanidyny, mocznik (zaburzają działanie polimerazy), heparyna i jony Ca^{2+} (uniemożliwiają przyłączenie się jonów Mg^{2+} do enzymu polimerazy powodując jego dezaktywację). Metody stosowane do izolacji DNA ukierunkowane są na usunięcie inhibitorów reakcji amplifikacji obecnych w badanych próbach, które wykrywane są za pomocą metody real – time PCR [1,23,28,44,47].

W celu zminimalizowania działania inhibitorów można zastosować rozcieńczenie próby, które spowoduje również rozcieńczenie inhibitorów i umożliwi reakcję amplifikacji przy mniejszej ilości czynnika hamującego. Alternatywnie dodanie większej ilości DNA umożliwi przeprowadzenie reakcji amplifikacji cząsteczek DNA,

które nie uległy inhibicji. Czynnikiem minimalizującym inhibicję PCR jest dodanie albuminy surowicy bydlęcej bądź betainy, a czynnikiem neutralizującym działanie inhibitorów polimerazy jest dodanie wodorotlenku sodu [10].

Problemem często spotykanym w badaniu genetyczno – sądowym jest analiza śladowych ilości DNA. Metodą opracowaną do rozwiązania tego typu problemu jest profilowanie DNA niskiej liczby kopii (ang. Low Copy Numer – LCN), którą należy zastosować przy analizie prób zawierających pojedyncze komórki. Metoda ta opiera się na zwiększeniu liczby cykli reakcji amplifikacji w celu zwiększenia czułości stosowanej metody. Podejście to przynosi dość zadowalające efekty, ale wymaga ostrożności w interpretacji wyników w związku z powieleniem artefaktowych sekwencji i związanych z tym błędów identyfikacyjnych [46,57,58].

Kolejnym wyzwaniem dla genetyka sądowego jest analiza wyników stanowiących mieszaninę profili DNA. Istotne jest stosowanie wysoce czułych metod, które pozwolą stwierdzić obecność DNA mniejszej komponenty i obliczyć jej procentowy udział w mieszaninie. Obecność mieszaniny można stwierdzić, gdy w poszczególnych loci występuje powyżej 2 alleli. Jednakże przy uzyskaniu trzech lub więcej pików należy wziąć pod uwagę, iż mogą stanowić one artefakty czy też stuttery reakcji PCR, a nie właściwe allele mieszaniny DNA. Dodatkowe piki obecne w pojedynczym locus mogą być też wynikiem mutacji, np. translokacji czy trisomii [14,22].

Praca genetyka sądowego wiąże się także z analizą materiałów zawierających zdegradowany DNA. Obecne są zestawy, które poza detekcją specyficznie ludzkiego DNA dają możliwość oceny jakości materiału genetycznego. Detekcja zdegradowanego DNA opiera się na równoczesnej amplifikacji dwóch sekwencji autosomalnych – jednej krótkiej, drugiej długiej. Gdy integralność DNA jest nienaruszona oba amplicony powielą się z taką samą wydajnością. Wtedy stosunek stężeń krótkiej sekwencji do długiej jest równy 1. Przy zdegradowanym DNA sekwencja dłuższa replikuje się z mniejszą wydajnością. Następuje wtedy wzrost wskaźnika będącego ilorazem stężeń ampliconu krótszego i dłuższego [24,32,53].

Precyzyjne określenie stężenia i jakości DNA w badanej próbce daje informację o możliwości ustalenia specyficznego osobniczo profilu STR. W przypadku słabej jakości czy też śladowej ilości analizowanej próby ustalenie profilu DNA na podstawie markerów STR nie zawsze jest możliwe. Pracując z próbą o silnej degradacji DNA pomocne w detekcji polimorfizmu są markery typu SNP (ang. Single Nucleotide Polymorphism) o zmienności w obrębie pojedynczych nukleotydów, występujące średnio co 100 – 300 par zasad w genomie. Markery SNP znalazły także zastosowanie w analizie pochodzenia biogeograficznego ze względu na istotne różnice w częstości alleli pomiędzy grupami etnicznymi oraz przy ustalaniu pamięciowego portretu cech sprawcy na podstawie profilu genetycznego. W przypadku pracy ze śladowym, zdegradowanym materiałem, przy analizie kości czy trzonów włosów analiza mitochondrialnego DNA (ang. mitochondrial DNA – mtDNA) z wykorzystaniem techniki sekwencjonowania często stanowi jedyną szansę na genetyczną indywidualizację próbki. Daje możliwość identyfikacji zwłok i szczątków ludzkich w oparciu o badanie nawet bardzo dalekich krewnych w linii matczynej [7,60].

4. Analiza ilościowa i jakościowa DNA.

4.1. Nieselektywne metody pomiaru stężenia DNA.

Z analitycznego punktu widzenia krytycznym etapem, który wpływa na skuteczność profilowania DNA jest pomiar ilości materiału genetycznego w badanych próbach. Oszacowanie stężenia wyizolowanego DNA warunkuje prawidłowy przebieg analizy profilowania, dla której wymagany jest wąski zakres optymalnej ilości DNA matrycowego [7,53].

Szybką i prostą metodą pomiaru w szerokim zakresie stężenia DNA jest technika spektrofotometryczna wykorzystująca zjawisko absorpcji promieniowania UV o długości fali 260 nm przez zasady azotowe kwasów nukleinowych. Poprzez wyznaczenie wskaźnika 260/280 możliwa jest ocena czystości izolatu DNA. Inna metoda umożliwiająca pomiar stężenia DNA polega na zastosowaniu barwnika

fluorescencyjnego wiążącego się z dwuniciowym DNA, który emituje światło o odpowiedniej długości fali. Siła emisji jest proporcjonalna do ilości barwnika związanego z DNA, a tym samym do stężenia DNA w próbce [25,40,41]. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (ang. real – time PCR) z zastosowaniem fluorochromu niespecyficznie interkalującego między dwuniciową strukturę DNA pozwala na automatyzację oraz uzyskanie wysokiej czułości, co daje jej przewagę w stosunku do innych technik pomiaru stężenia DNA [21,30].

4.2. Selekttywne metody analizy stężeń oraz oceny jakościowej DNA.

Obecnie do oceny DNA w genetyce sądowej najczęściej wykorzystywana jest technika ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy – QR – PCR (ang. quantitative real – time PCR) z zastosowaniem sond TaqMan. Pozwala ona na przeprowadzenie selektywnej detekcji i oceny ilości ludzkiego autosomalnego czy też męskiego DNA w próbach. Dodatkowo daje ona możliwość wykrycia inhibitorów reakcji PCR oraz oceny stopnia degradacji DNA [29,36].

Zestaw Quantifiler Duo Quantification Kit firmy Applied Biosystems opiera się na metodzie multipleks real – time PCR. Umożliwia on detekcję ludzkiego i męskiego DNA w oparciu o sondy odpowiednio komplementarne do sekwencji autosomalnej czy też sekwencji chromosomu Y. Pozwala na ocenę domieszki męskiego komponentu DNA obecnego w mieszaninie zawierającej znaczną przewagę żeńskiego DNA, co jest szczególnie przydatne w analizie materiałów pochodzących z przestępstw popełnianych na tle seksualnym [5].

Jedna z sond użytych w tym zestawie jest komplementarna do sekwencji autosomalnej DNA człowieka – sekwencji genu RPPH1 zlokalizowanego na chromosomie 14 o długości amplikonu 140 par zasad. Druga sonda wykrywa selektywnie męskie DNA będąc komplementarną do sekwencji genu SRY o długości 130 par zasad. Dodatkowo w skład zestawu wchodzi kontrola wewnętrzna – IPC (ang. Internal PCR Control) i jest oznaczana za pomocą trzeciej sondy komplementarnej do syntetycznej sekwencji o długości 130 par zasad [4,29]. Szczegółową charakterystykę sekwencji

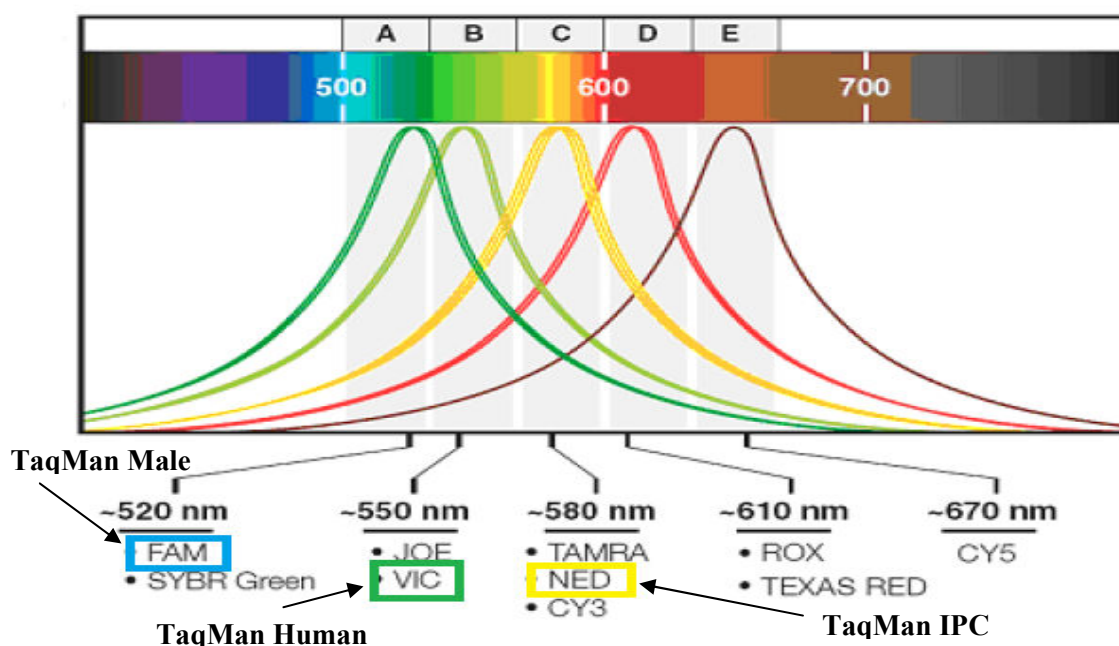
wykrywanych przez sondy TaqMan zawarte w zestawie Quantifiler Duo przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka sekwencji genomu ludzkiego, dla których zaprojektowane zostały sondy TaqMan w zestawie Quantifiler Duo.

Sekwencja docelowa	Gen docelowy	Lokalizacja w genomie	Długość amplikonu	Nr ID genu	Ploidalność
Sekwencja ludzka	Rybonukleaza P RNA komponenta H1 (RPPH1)	14q11.2	140 pz	85495	diploidalny
Sekwencja męska	Gen SRY	Yp11.3	130 pz	6736	haploidalny

Opracowano na podstawie Tab.1-1 Applied Biosystems. Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit. User's manual. USA, 2008, 4391294 Rev. A

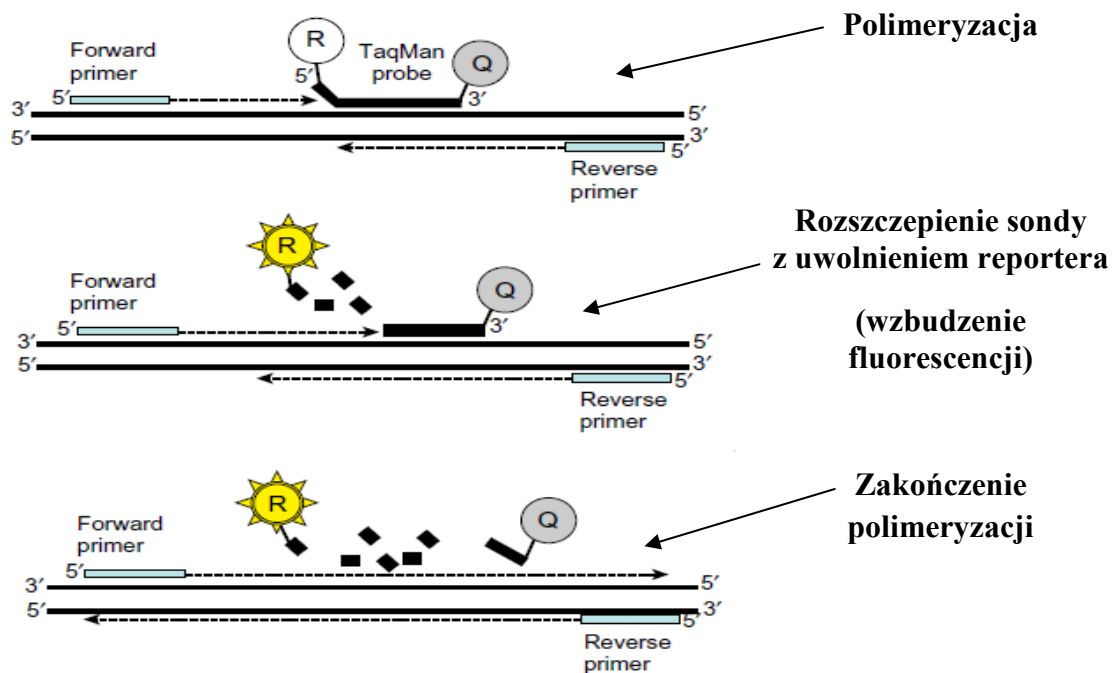
Każda z sond wyznakowana jest innymi znacznikami fluorescencyjnymi, które wykazują różne zakresy emisji światła, co obrazuje Rycina 2.



Rycina 2. Znaczniki fluorescencyjne VIC, FAM, NED wykorzystane do znakowania sond wykrywających sekwencje: RPPH1, SRY, IPC, użyte w zestawie Quantifiler Duo.

Opracowano na podstawie Fig.1-7 Applied Biosystems. Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit. User's manual. USA, 2008, 4391294 Rev. A

Sondy wyznakowane barwnikami fluorescencyjnymi emitują promieniowanie o różnej długości fali. Reporter (ang. Reporter – R) przyłączony jest do końca 5' sondy, podczas gdy wygaszacz (ang. Quencher – Q) przyłączony jest do końca 3' sondy. W stanie spoczynku, gdy w próbce nie są obecne szukane sekwencje DNA emisja promieniowania fluorescencyjnego reportera jest absorbowana przez wygaszacz znajdujący się w jego bliskim położeniu. Obecność badanych sekwencji DNA powoduje związanie sond i zajęcie replikacji. W czasie reakcji amplifikacji polimeraza DNA, która wykazuje aktywność 5' – egzonukleazy w fazie wydłużania powoduje hydrolizę sondy, co skutkuje oddaleniem reportera od wygaszacza. To z kolei prowadzi do swobodnej emisji promieniowania fluorescencyjnego (Rycina 3).



Rycina 3. Schemat reakcji real – time PCR z wykorzystaniem sondy TaqMan.

Opracowane na podstawie Fig. 3.4. Butler J.M. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology, Academic International Press, 2011, 56

Sondy molekularne, które zwiążą się do cząstek DNA w badanej próbce emitują siłę sygnału fluorescencji, która jest wprost proporcjonalna do stężenia ludzkiego czy też męskiego DNA [10,20].

Stężenie sekwencji badanej, powielanej podczas PCR, oceniane jest na podstawie liczby cykli reakcji potrzebnych do powstania takiej liczby cząstek produktu, która wygeneruje sygnał fluorescencyjny o intensywności powyżej tzw. wartości progowej (F_t – fluorescence treshold). Liczba cykli, która jest potrzebna do przekroczenia progowej wartości jest odwrotnie proporcjonalna do ilości amplikonu wykorzystanej do reakcji. Cykl, przy którym dochodzi do przekroczenia progowej fluorescencji nosi nazwę cyklu progowego (ang. threshold cycle – C_t) i rozpoczyna on etap wykładniczego gromadzenia się produktu. Technika QR – PCR umożliwia pomiar przyrastającej ilości produktu w każdym cyklu reakcji amplifikacji, która jest zależna od ilości DNA użytej do reakcji, a także wydajności reakcji amplifikacji [3,4,31,55].

Dodatkowo zestaw umożliwia detekcję inhibitorów obecnych w próbach poprzez wprowadzenie sekwencji syntetycznego oligonukleotydu o pewnym stężeniu znanym przez producenta, określanego mianem kontroli wewnętrznej (IPC), do której przyporządkowana jest znana wartość C_t . W prawidłowych warunkach reakcji zawarta jest ona pomiędzy 28 a 31 cyklem reakcji. Jeżeli przy zastosowanej kontroli wewnętrznej uzyskuje się wyższą wartość C_t od spodziewanej oznacza to, że w mieszaninie reakcyjnej obecne są inhibitory obniżające efektywność prowadzonej reakcji powielania. Producent wskazuje również na możliwość przesunięcia cyklu C_t dla IPC w kierunku wyższych wartości w związku z wysokim stężeniem DNA w próbce badanej [4,28,47].

5. Walidacja w laboratoriach genetyczno-sądowych.

Zważając na moc dowodową, jaką daje profilowanie DNA, niezwykle ważne jest przeprowadzanie analiz genetycznych w oparciu o ściśle określone, wysokie standardy. Pozwalają one na ujednoczenie procedur badawczych, a dzięki temu wymianę danych pomiędzy laboratoriami. Uczestnictwo w testach biegłości jest istotnym narzędziem w monitorowaniu jakości wykonywanych oznaczeń dla potrzeb wymiaru sprawiedliwości. Uzyskiwane certyfikaty Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sądowej (ang. International Society of Forensic Genetics – ISFG), Niemieckiej Grupy ds. Profilowania DNA (ang. German DNA Profiling Group –

GEDNAP) czy też atesty Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii (PTMSiK) potwierdzają właściwe wykonywanie oznaczeń DNA z zakresu badania śladów biologicznych oraz ustalania ojcostwa. Nieodzownym elementem zapewniającym kontrolę nad wiarygodnością wykonywanych badań jest przeprowadzanie walidacji stosowanych metod oraz aparatury badawczej.

Walidacja to proces, w którym procedura badawcza zostaje oceniona pod względem jej efektywności i wiarygodności. Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (ang. International Standards Organization – ISO) w normie ISO PN/EN 17025: 2005 nakłada na laboratorium obowiązek przeprowadzenia walidacji metod badawczych i określenia zakresu niepewności wyników badań [34,35,52]. Norma ta nie wskazuje sposobu, w jaki ma zostać przeprowadzona, przedstawia tylko działania i narzędzia mogące jej służyć. Sposoby i zasady przeprowadzenia walidacji w laboratoriach genetyczno – sądowych wykonujących badania DNA zostały przedstawione w postaci wytycznych i wskazówek organizacji zajmujących się tą tematyką, tj. Naukowej Grupy Roboczej ds. Analizy DNA (ang. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods – SWGDAM), a także Grupy Roboczej ds. DNA Europejskiej Sieci Laboratoriów Nauk Sądowych (ang. DNA Working Group of the European Network of Forensic Science Institutes – DNA WG ENFSI).

Chcąc wprowadzić bądź zmodyfikować technologię analizy DNA w kryminalistyce wymagane są dwa typy walidacji – rozwojowa i wewnętrzna (ang. developmental and internal validation). Producenci, organizacje techniczne, instytucje akademickie czy laboratoria naukowe muszą przeprowadzić **walidację rozwojową** przy wprowadzaniu nowej metody na potrzeby analizy DNA. Z kolei **walidacja wewnętrzna** przeprowadzana jest w laboratorium, które zamierza stosować daną procedurę. Stanowi ona wewnętrzny test niezawodności metody, a także pozwala na zbadanie jej ograniczeń i weryfikację oznaczeń przeprowadzonych przez producenta. Dzięki temu można określić, na ile procedura ta jest skuteczna w warunkach pracy konkretnego laboratorium [16,50,52].

Do przeprowadzenia walidacji systemu Quantifiler Duo DNA Quantification Kit poddano ocenie:

1. Precyzję metody w zakresie powtarzalności i odtwarzalności.

Precyzja metody to stopień zgodności między niezależnymi wynikami uzyskanymi w serii oznaczeń w trakcie analizy danej próbki. Nie odnosi się ona do rzeczywistej lub określonej wartości, natomiast jest miarą rozrzutu wyników pomiarów wokół wartości średniej.

Powtarzalność ocenia precyzję wyników uzyskanych z pomiarów przeprowadzonych przez tę samą osobę w tych samych warunkach pomiarowych (dane laboratorium, analityk, przyrząd pomiarowy, odczynniki). Wyrażana jest za pomocą odchylenia standardowego, wariancji, względnego odchylenia standardowego lub współczynnika zmienności.

Odtwarzalność opisuje precyzję wyników uzyskanych przez różnych analityków lub w pewnym odstępie czasowym z zastosowaniem danej metody pomiarowej [38,59].

2. Czulość metody obejmuje wyznaczenie zakresu stężeń, dla których wyniki oznaczeń są wiarygodne. Obejmuje także analizę efektu stochastycznego, który występuje w przypadku badania prób zawierających DNA w niewielkiej ilości i/lub jakości, co skutkuje utratą precyzji bądź brakiem detekcji w wykonywanych oznaczeniach.

3. Analizę mieszanin poprzez detekcję komponent obecnych w próbach i wyznaczenia minimalnego wykrywanego odsetka męskiego DNA.

Dodatkowe aspekty procedury walidacyjnej obejmują zestawienie z innymi metodami badawczymi z uwzględnieniem zakresów pomiarowych, na jakich opierają się rutynowe oznaczenia [16,50].

II. Cel pracy

Każda procedura, która ma znaleźć zastosowanie w laboratorium wymaga przeprowadzenia walidacji wewnętrznej. Daje to gwarancję wiarygodności i powtarzalności uzyskiwanych wyników.

Ocena jakościowa i ilościowa DNA w oparciu o reakcję real-time PCR jest krytycznym etapem w analizie genetyczno-sądowej poprzedzającym uzyskanie osobniczo specyficznych profili DNA.

Celem niniejszej pracy było przeprowadzenie walidacji wewnętrznej zestawu Quantifiler Duo DNA Quantification Kit firmy Applied Biosystems.

Procedura walidacyjna obejmowała:

1. Stworzenie krzywej standardowej zależności cyklu C_t względem stężenia DNA.
2. Analizę wskaźnika inhibicji (IPC) w badanych próbach.
3. Ocena precyzji metody w zakresie powtarzalności i odtwarzalności pomiarów.
4. Określenie czułości metody badawczej na podstawie ustalenia dolnego progu detekcji i analizy mniejszościowej komponenty mieszaniny DNA.
5. Porównanie uzyskanych wyników stężeń dla prób kontrolnych ze stężeniami podanymi przez producenta.
6. Porównanie przeprowadzonych pomiarów stężeń techniką real-time z pomiarami uzyskanymi w oparciu o metodę fluorymetryczną.
7. Porównanie przeprowadzonych pomiarów stężeń techniką real-time z odczytem RFU w oparciu o metodę elektroforezy kapilarnej.

III. Materiał i metodyka badań

1. Materiał.

1.1. Do badań wykorzystano standard o stężeniu 200 ng/μl pochodzący z zestawu Quantifiler Duo w celu wyznaczenia krzywej standardowej cyklu C_t względem stężenia DNA, oceny precyzji i czułości metody oraz jej zakresu pomiarowego.

1.2. Do porównania pomiarów przeprowadzonych walidowaną metodą oraz techniką elektroforezy kapilarnej wykorzystano wymienione poniżej próby kontrolne zawarte w zestawach do amplifikacji o podanych stężeniach producenta:

K1: AmpFℓSTR DNA Control 007 **XY 0,1 ng/μl**, AmpFℓSTR® NGM™ PCR Amplification Kit firmy Applied Biosystems

K2: AmpFℓSTR DNA Control 007 **XY 2 ng/μl**, AmpFℓSTR® Yfiler® Plus PCR Amplification Kit firmy Applied Biosystems

K3: Control DNA XY5 **XY 2 ng/μl**, Investigator® DIplex Kit firmy Qiagen

K4: Control DNA 9948 **XY 0,1 ng/μl**, Investigator® HDplex Kit firmy Qiagen

K5: AmpFℓSTR Control DNA 9947A **XX 0,1 ng/μl**, AmpFℓSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit firmy Applied Biosystems

K6: AmpFℓSTR Control DNA 9947A **XX 10 ng/μl**, AmpFℓSTR® Yfiler™ PCR Amplification Kit firmy Applied Biosystems

K7: Control DNA 9947A **XX 0,1 ng/μl**, Investigator Argus X-12 Kit firmy Qiagen

1.3. Do oceny czułości zestawu Quantifiler Duo, określenia zakresu pomiarowego, analizy mieszanin DNA, zestawień porównawczych uzyskanych stężeń techniką real – time PCR w stosunku do pomiarów metodą fluorymetryczną wykorzystano próby dowodowe DNA pochodzące z ekspertyz medyczno – sądowych, zdeponowane w Pracowni Genetyki Medycznej i Sądowej Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, których dysponentem jest promotor pracy.

Na wykorzystanie wyżej wymienionych prób do przedmiotowych badań uzyskano zgodę Komisji Bioetyki nr RNN/168/15/KB z dnia 17 lutego 2015 roku.

2. Metodyka badań.

2.1. Wykonanie reakcji amplifikacji.

W kolejnych etapach przeprowadzonej reakcji real – time PCR z użyciem zestawu Quantifiler Duo wykonano następujące czynności:

2.1.1. Przygotowano reagenty:

- rozmrożono Quantifiler Duo Primer Mix, zworteksowano i odwirowano,
- wymieszano delikatnie Quantifiler Duo PCR Reaction Mix, nie worteksowano.

2.1.2. Rozpipetowano odpowiednie objętości reagentów do stworzenia mieszaniny reakcyjnej złożonej z Primer Mix i Reaction Mix, których skład i proporcje szczegółowo przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Składowe mieszaniny reakcyjnej z wykorzystaniem zestawu Quantifiler Duo DNA Quantification Kit.

Reagent	Skład	Objętość na jedną reakcję [μl]
Quantifiler® Duo Primer Mix	Trzy pary primerów do amplifikacji regionów RPPH1, SRY oraz IPC, sondy TaqMan® do sekwencji RPPH1, SRY oraz IPC znakowane barwnikami VIC®, FAM™ i NED™, kontrola IPC	10,5
Quantifiler® Duo PCR Reaction Mix	MgCl ₂ , dNTPs, albumina surowicy bydlęcej, AmpliTaq Gold® DNA polimeraza w buforze i solach, azydek sodu (0,02%)	12,5

Opracowano na podstawie Applied Biosystems. Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit. User's manual. USA, 2008, 4391294 Rev. A, 1-16, 3-5

2.1.3. Zworteksowano zawartość, następnie krótko odwirowano.

2.1.4. Porozdzielano do każdego dołka reakcyjnego po 23μl mieszaniny reakcyjnej.

2.1.5. Dodano 2μl próby/standardu/kontroli.

2.1.6. Przykryto powierzchnię płytki osłoną.

2.1.7. Odwirowano płytkę w warunkach 4500 rpm przez 3 minuty w celu usunięcia pęcherzyków powietrza.

2.1.8. Zaprojektowano płytkę reakcyjną do amplifikacji.

2.1.9. Umieszczono płytkę w aparacie.

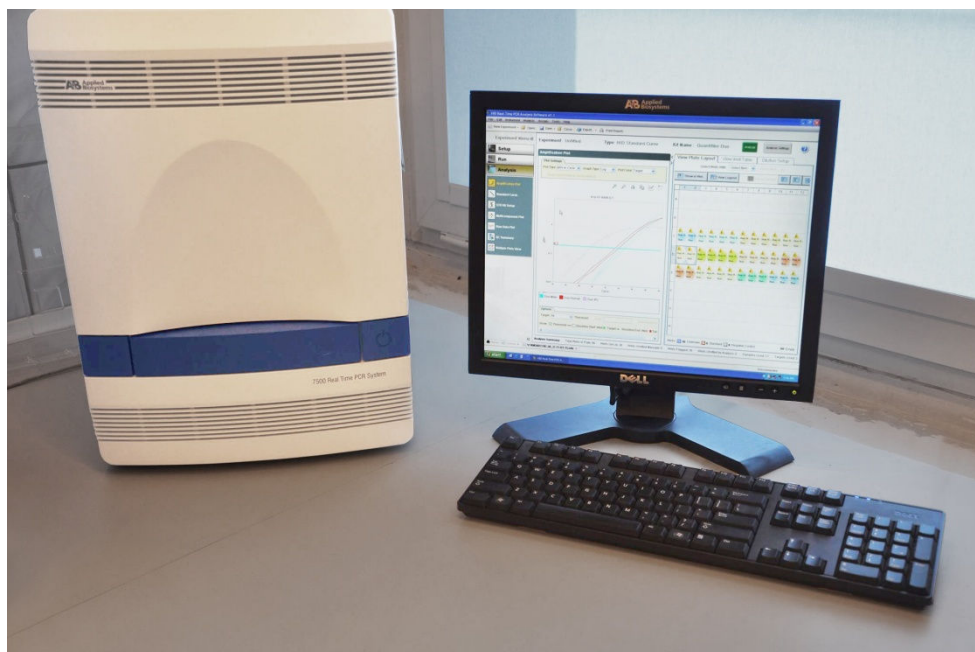
2.1.10. Przeprowadzono reakcję amplifikacji z wykorzystaniem oprogramowania HID Real – Time PCR Analysis Software v1.1 na aparacie 7500 Real – Time PCR System, który przedstawiono na Rycinie 4.

Reakcja amplifikacji przebiegała z odpowiednim profilem temperaturowym:

Etap 1: 50°C przez 2 minuty

Etap 2: 95°C przez 10 minut

Etap 3: 95°C przez 15 sekund
60°C przez 1 minutę } liczba powtórzeń: 40



Rycina 4. Aparat 7500 Real – Time PCR System z oprogramowaniem HD Real –Time PCR Analysis Software v1.1 (Pracownia Genetyki Medycznej i Sądowej Katedry i ZMS UM w Łodzi).

2.2. Sporządzenie krzywej standardowej.

Wewnętrzną walidację zestawu przeprowadzono w oparciu o własną krzywą standardową sporządzoną na podstawie standardu z zestawu Quantifiler Duo o stężeniu wyjściowym 200 ng/μl i serii jego rozcieńczeń: 100 ng/μl; 50 ng/μl;

5 ng/μl; 0,5 ng/μl; 0,05 ng/μl; 0,005 ng/μl. Rozcieńczenia wykonywano za pomocą dołączonego do zestawu buforu (Dilution Buffer). W celu zapewnienia precyzji pipetowania minimalna objętość zastosowana do rozcieńczenia wynosiła 10 μl. Wykonano reakcję amplifikacji dla wyżej wymienionych rozcieńczeń standardu w ilości od 3 do 8 powtórzeń pomiarowych. Uzyskano wykresy zależności ΔR_n (znormalizowana wartość reportera) od liczby cykli reakcji PCR. ΔR_n stanowi stosunek intensywności fluorescencji barwnika reporterowego do intensywności fluorescencji barwnika pasywnego wyznaczany w skali logarytmicznej. Z uzyskanych krzywych reakcji amplifikacji odczytywano wartości C_t , które ustalono na poziomie wartości progowej wynoszącej 0,2. Kolejnym krokiem było wygenerowanie w programie STATISTICA krzywych standardowych przedstawiających zależność cyklu C_t dla sekwencji człowieka (Duo Human) oraz specyficznej dla mężczyzny (Duo Male) względem stężenia DNA. Krzywe przyjmują ogólną postać:

$$C_t = m[\log(Q_{ty})] + b \quad [4]$$

m – współczynnik nachylenia – określa wydajność reakcji; powinien zawierać się w zakresie -3,0 a -3,6; wartość -3,3 wskazuje na maksymalną wydajność reakcji [4]

b – Y - intercept – przecięcie osi Y; spodziewana wartość C_t dla próbki o ilości równej 1 (np. ng/μl) [51]

Q_{ty} – początkowe stężenie DNA w próbce

Krzywa, z której możemy dokonać odczytu stężenia DNA próby badanej powinna mieć współczynnik determinacji R^2 powyżej 0,98. Współczynnik ten jest miarą siły związku liniowego pomiędzy zestawianymi parametrami. Im wyższa wartość R^2 , tym lepsza zależność liniowa między wartością C_t a stężeniem DNA [4,51].

Z przeprowadzonych oznaczeń wygenerowano wykres zależności C_t dla wskaźnika inhibicji (IPC) względem oznaczonego stężenia DNA. Na podstawie wykresu oraz krzywych reakcji amplifikacji dokonano oceny wpływu wysokich stężeń DNA w próbce na wartość C_t dla IPC. Wartość IPC wskazująca na brak inhibicji i prawidłowy przebieg reakcji real – time PCR powinna zawierać się w przedziale

28 – 31 cyklu C_t . Wartości IPC przekraczające 31 cykl C_t stanowiący górny akceptowalny odczyt wskazują na wynik, którego wiarygodność jest wątpliwa [4].

2.3. Ocena precyzji metody.

Do oceny precyzji walidowanej metody wykorzystano analizę jej powtarzalności i odtwarzalności. Szczegółowe zestawienie przeprowadzonych pomiarów zawarto w Załączniku nr 1.

Do oceny powtarzalności wykonano sześciokrotny pomiar próbek o stężeniu 5 ng/ μ l oraz 0,05 ng/ μ l, które stanowiły rozcieńczenia standardu z zestawu Quantifiler Duo o stężeniu wyjściowym 200 ng/ μ l. Oznaczenia te zostały wykonane tego samego dnia, przez tego samego badacza w tym samym cyklu reakcji amplifikacji. Wszelkie obliczenia dokonano w programie STATISTICA 12. Za pomocą współczynnika zmienności (CV), który łączy w sobie wartości średniej (\bar{x}) i odchylenia standardowego (SD), dokonano oceny powtarzalności metody.

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} * 100\% \quad [59]$$

Wartość współczynnika CV nieprzekraczająca 10%, wskazywała na zróżnicowanie statystycznie nieistotne, a tym samym na powtarzalność uzyskanych pomiarów [59].

Do oceny odtwarzalności w odstępie czasowym kilkunastu dni przeprowadzono każdorazowo pięciokrotne pomiary standardu z zestawu Quantifiler Duo o stężeniu 200 ng/ μ l. Statystyczną analizę przeprowadzono w programie STATISTICA z użyciem testu t – Studenta oraz zgodności wariancji testu Levene’a na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. O wykonywaniu oznaczeń w sposób odtwarzalny świadczył brak statystycznej istotności różnic pomiędzy poszczególnymi pomiarami. Miało to miejsce wtedy, kiedy wartość prawdopodobieństwa (P) przekraczała poziom istotności ($P > 0,05$).

2.4. Oznaczenia prób o charakterze dowodowym.

Próby o charakterze dowodowym poddano analizie real – time PCR z zastosowaniem systemu Quantifiler Duo. Za pomocą uzyskanych wartości C_t oraz krzywych standardowych obliczono stężenia DNA dla sekwencji autosomalnej i sekwencji chromosomu Y, które zestawiono szczegółowo w Załączniku nr 2.

Uzyskane wysokie wartości stężeń DNA dla prób 7.18 oraz 2.24 posłużyły do oceny jakości oznaczeń dla maksymalnego zakresu badanego stężenia DNA autosomalnego i męskiego. Dokonano oceny wpływu wysokich stężeń na wartość cyklu C_t dla wskaźnika inhibicji (IPC).

Próby o niskich stężeniach DNA: 1.4, 1.10, P74K15 wykorzystano do analizy czułości. Do oceny progu detekcji DNA wykorzystano także rozcieńczenia standardu o stężeniach: 0,4; 0,2; 0,04; 0,02; 0,004 ng/ μ l, które oznaczono od 2 do 5 razy. Uzyskane wartości niskich stężeń oceniono pod względem stopnia precyzji pomiarów w serii oznaczeń oraz występowania efektu stochastycznego.

Czułość zestawu Quantifiler Duo oceniono także pod względem najniższego odsetka DNA męskiego, które wykryto w próbach stanowiących mieszaniny. W tym celu wykorzystano próby 1.4; 1.10; 1.24; 3.30 oraz P74K15.

2.5. Porównanie oznaczeń uzyskanych metodą real – time PCR z innymi technikami pomiarowymi.

2.5.1. Porównanie pomiarów stężeń prób kontrolnych.

Dokonano oznaczeń prób kontrolnych K1 – K7 przy użyciu zestawu Quantifiler Duo w ilości powtórzeń 4 lub 6 razy. Dla każdego z pomiarów obliczono stężenia DNA w oparciu o uzyskane wartości C_t i krzywe standardowe. Następnie obliczono średnie stężenie DNA dla Duo Human i Duo Male. W celu porównania średnich wartości stężeń materiałów kontrolnych w stosunku do stężeń podanych przez producenta przy pomocy programu STATISTICA wykonano test t – Studenta na poziomie istotności $\alpha= 0,05$.

2.5.2. Porównanie oznaczeń stężenia DNA z pomiarami fluorymetrycznymi.

38 prób, których stężenie oznaczono z wykorzystaniem zestawu Quant – iT HS dsDNA i fluorymetru Qubit porównano do wartości uzyskanych za pomocą walidowanej metody. Do porównania wartości stężeń wyznaczonych za pomocą zestawu Quant – iT HS dsDNA oraz systemu Quantifiler Duo wykorzystano odpowiednio stężenia całkowitego DNA oraz stężenia DNA autosomalnego. Oznaczenia uznawano za zbliżone wtedy, gdy ich wzajemny stosunek bliski był jedności. Stężenia dla tych samych prób wyznaczonych w oparciu o dwie techniki pomiarowe przedstawiono w formie graficznej za pomocą wykresów kolumnowych grupowanych wykonanych w programie Microsoft Excel.

2.5.3. Określenie zależności między ilością DNA użytą w reakcji PCR a średnią wartością RFU.

Do porównania stężeń oznaczonych za pomocą metody real – time PCR oraz poziomu sygnału fluorescencji RFU dla uzyskanych profili DNA w rozdziale za pomocą sekwenatora kapilarnego wykorzystano kontrole K1, K2, K5. Dla każdej z prób przy użyciu wody dejonizowanej sporządzono rozcieńczenia według metodyki przedstawionej w Tabeli 3. Tak przygotowane próby poddano amplifikacji w systemie multipleksowym z zastosowaniem zestawu AmpF ℓ STR NGM PCR Amplification Kit. Kolejnym krokiem było przeprowadzenie rozdziału elektroforetycznego z użyciem aparatu Genetic Analyzer 3500 firmy Applied Biosystems.

Odczyt wartości względnej jednostki fluorescencji (RFU) dla uzyskanych profili DNA nastąpił w oparciu o wysokości alleli wszystkich 15 loci STR i amelogeniny. Układy homozygotyczne do obliczeń klasyfikowano jako podwójny identyczny sygnał RFU. W oparciu o obliczoną wartość średniego RFU dla poszczególnych prób kontrolnych przeprowadzono ocenę zależności między wsadową ilością DNA użytą do reakcji multipleks PCR, a uzyskaną wartością sygnału fluorescencji w elektroforezie kapilarnej. Analizie poddano także optymalną ilość DNA skutkującą uzyskaniem

właściwego profilu STR oraz konsekwencje wynikające ze zbyt dużej i zbyt małej ilości DNA dodanej do reakcji amplifikacji.

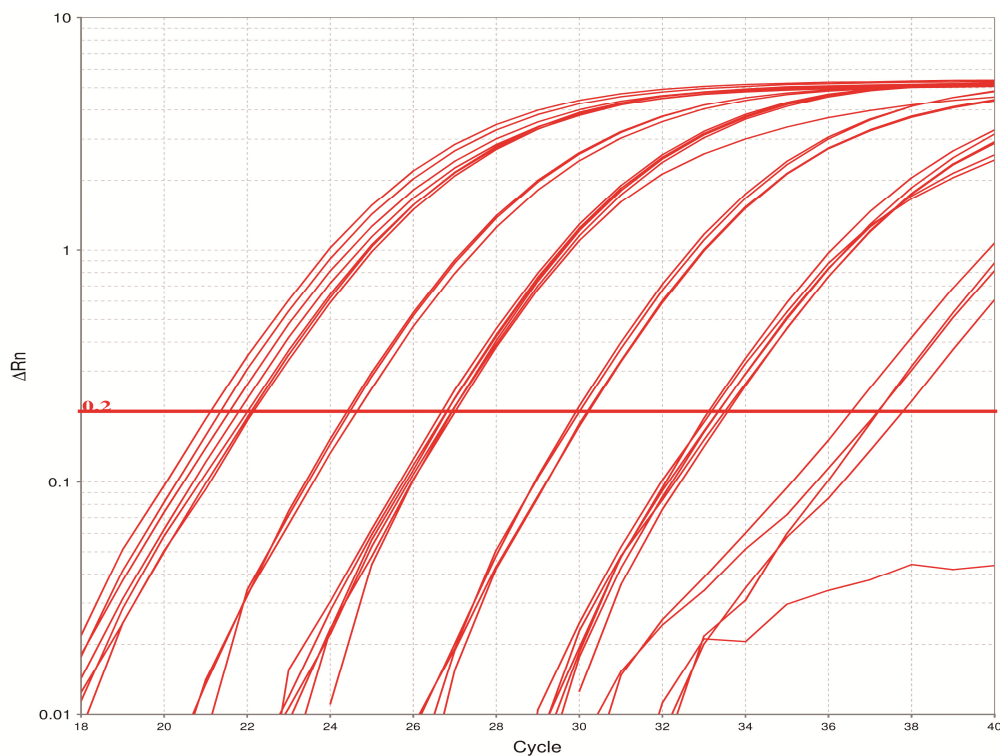
Tabela.3. Rozcieńczenia materiałów kontrolnych poddanych reakcji multipleks PCR i rozdzielowi elektroforetycznemu.

Nazwa	Rozcieńczenie	Ilość DNA w 1 μ l	Ilość DNA w reakcji PCR
K1: XY 0,1ng/ μ l	-	0,1 ng	0,3 ng
	2x	0,05 ng	0,15 ng
	3x	0,033 ng	0,1 ng
	5x	0,02 ng	0,06 ng
	10x	0,01 ng	0,03 ng
	20x	0,005 ng	0,015 ng
K2: XY 2ng/ μ l	-	2 ng	6 ng
	2x	1 ng	3 ng
	10x	0,2 ng	0,6 ng
	20x	0,1 ng	0,3 ng
K5: XX 0,1ng/ μ l	-	0,1 ng	0,3 ng
	2x	0,05 ng	0,15 ng
	3x	0,033 ng	0,1 ng
	5x	0,02 ng	0,06 ng
	10x	0,01 ng	0,03 ng
	20x	0,005 ng	0,015 ng

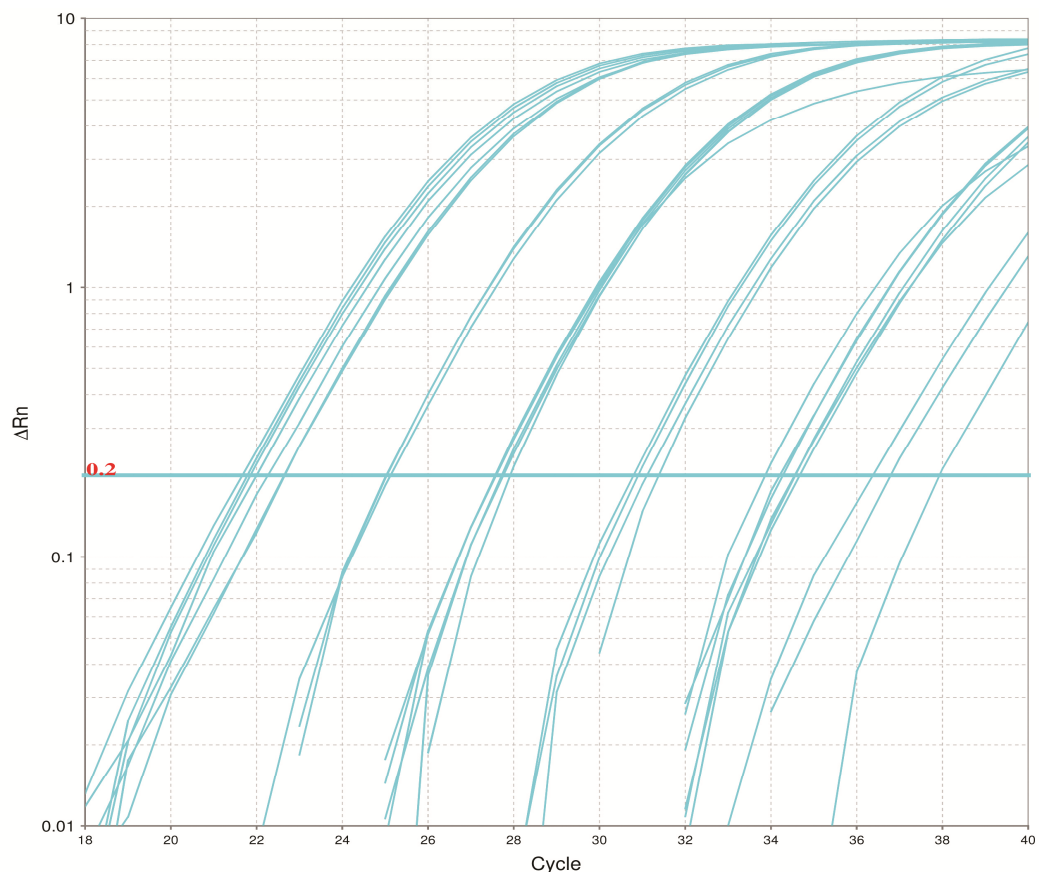
IV. Wyniki i omówienie

1. Sporządzenie krzywej standardowej.

Z przeprowadzonych oznaczeń uzyskano krzywe reakcji amplifikacji przedstawiające zależność ΔRn (znormalizowana wartość reportera) do liczby cykli reakcji PCR. Ze względu na specyficzną detekcję ludzkiego oraz męskiego DNA uzyskano krzywe amplifikacji dla sekwencji genu RPPH1 i genu SRY (Rycina 5 i 6). Krzywe te posłużyły do odczytu wartości cykli Ct, w których poziom fluorescencji przekraczał wartość progową wynoszącą 0,2. W celu walidacji metody konieczne było wykonanie krzywych standardowych zależności cyklu Ct względem stężenia DNA. Dzięki temu możliwa stała się ocena ilościowa DNA w próbach badanych.

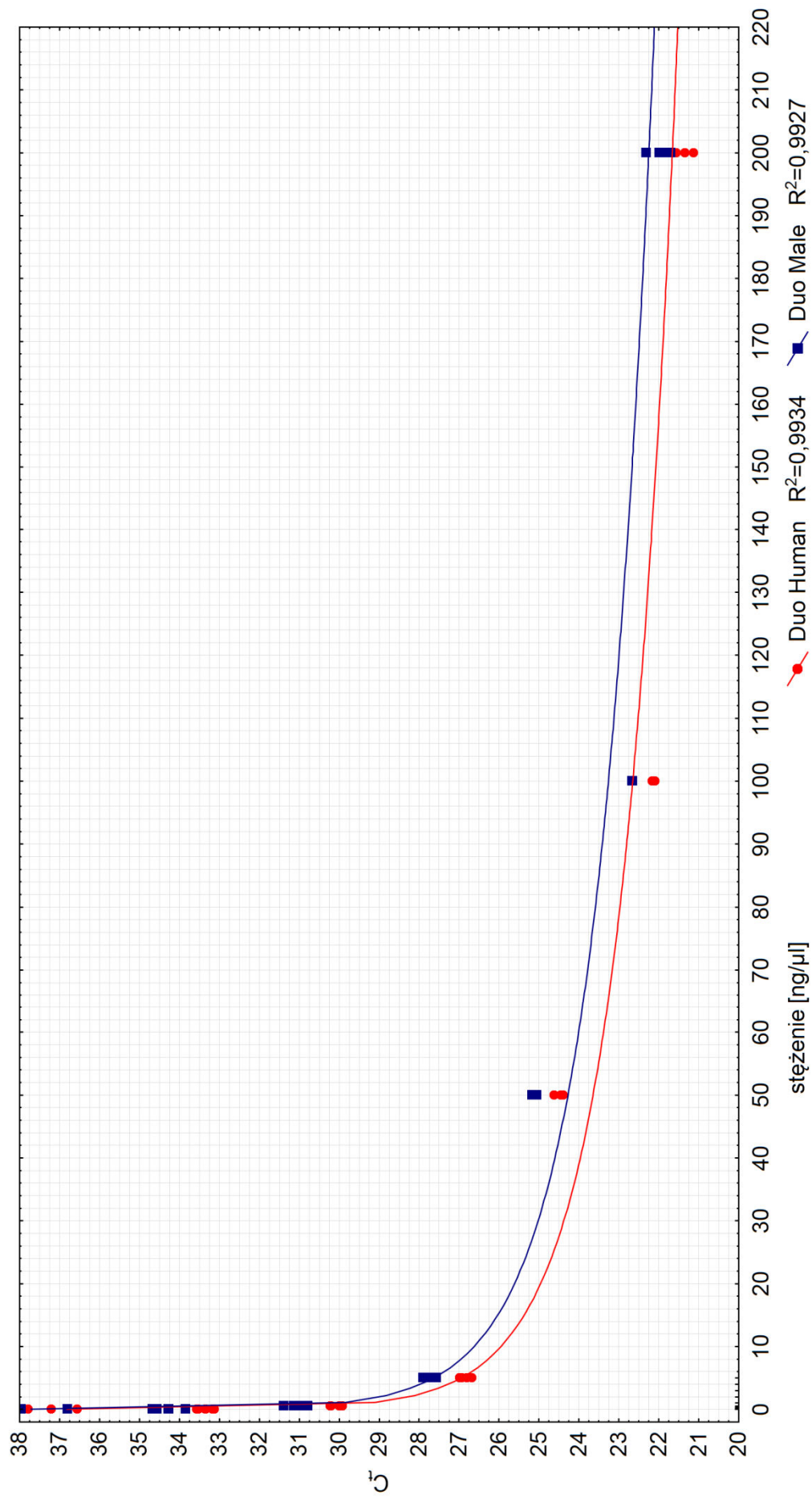


Rycina 5. Krzywe reakcji amplifikacji sekwencji autosomalnej DNA (Duo Human) dla standardu z zestawu Quantifiler Duo o stężeniu 200 ng/ μ l i serii jego kolejnych rozcieńczeń: 100; 50; 5; 0,5; 0,05; 0,005 ng/ μ l (Załącznik nr 1).

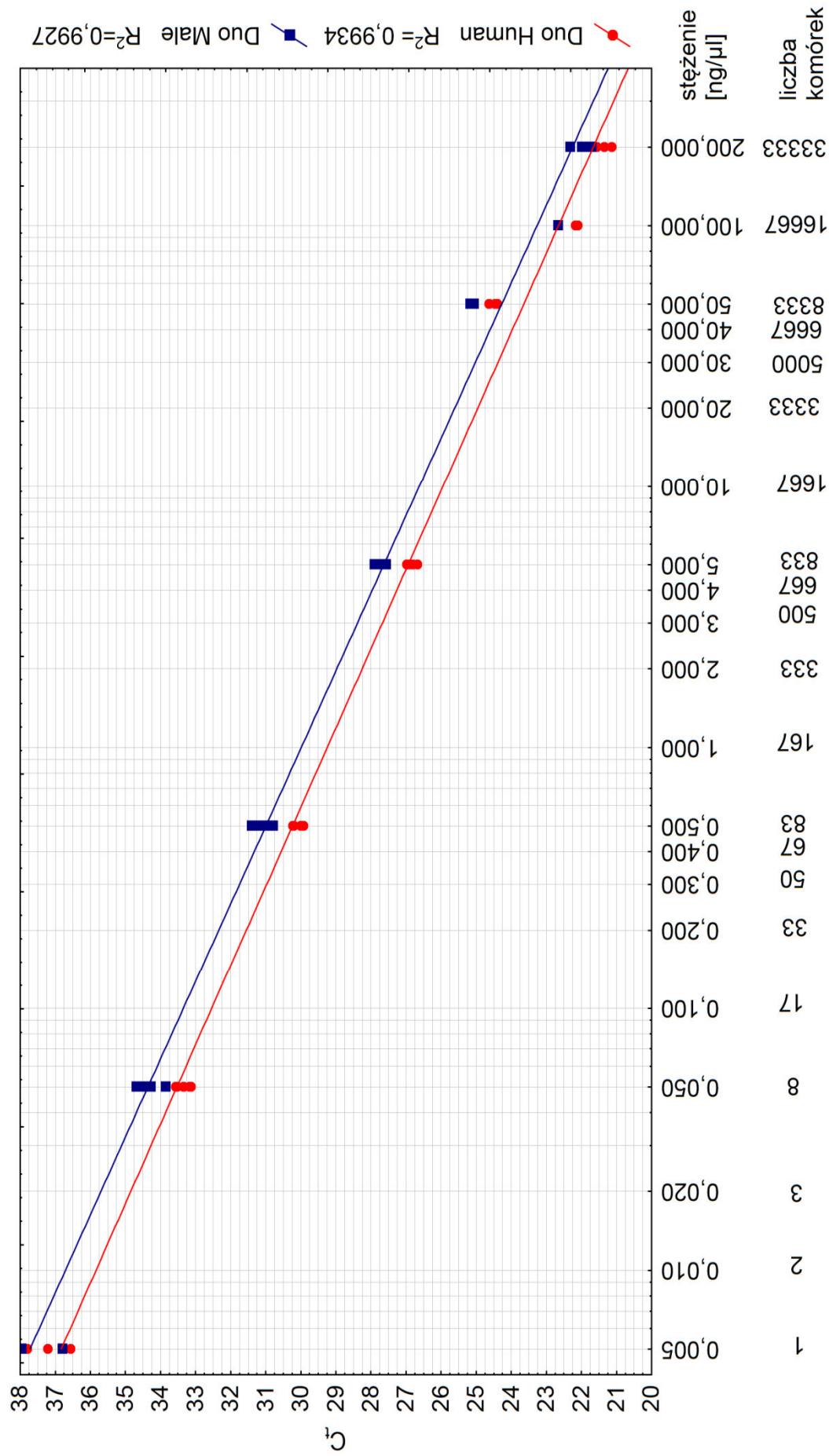


Rycina 6. Krzywe reakcji amplifikacji sekwencji chromosomu Y (Duo Male) dla standardu z zestawu Quantifiler Duo o stężeniu 200 ng/μl i serii jego kolejnych rozcieńczeń: 100; 50; 5; 0,5; 0,05; 0,005 ng/μl (Załącznik nr 1).

Krzywe standardowe przedstawiające zależność cyklu Ct od stężenia DNA ludzkiego i męskiego oraz odpowiadającej tym stężeniom liczbie komórek diploidalnych w badanych próbach, kolejno w skali liniowej i logarytmicznej przedstawiono na Rycinie 7 i 8. Dla Duo Human uzyskano krzywą o następującym wzorze: $DH = -3,2965 \log(x) + 29,2471$ a dla Duo Male o postaci $DM = -3,362 \log(x) + 29,9866$. Współczynnik nachylenia (m) dla sekwencji autosomalnej wyniósł -3,2965 a dla sekwencji chromosomu Y -3,362. Wartości te świadczą o optymalnej wydajności reakcji amplifikacji dla obu komponent DNA. Dla DNA autosomalnego współczynnik R^2 krzywej wyniósł 0,9934, a dla DNA męskiego 0,9927. Wartości te wskazują na dobrą korelację i związek liniowy wartości cykli Ct względem stężenia DNA, zarówno dla oznaczenia Duo Human, jak i Duo Male.



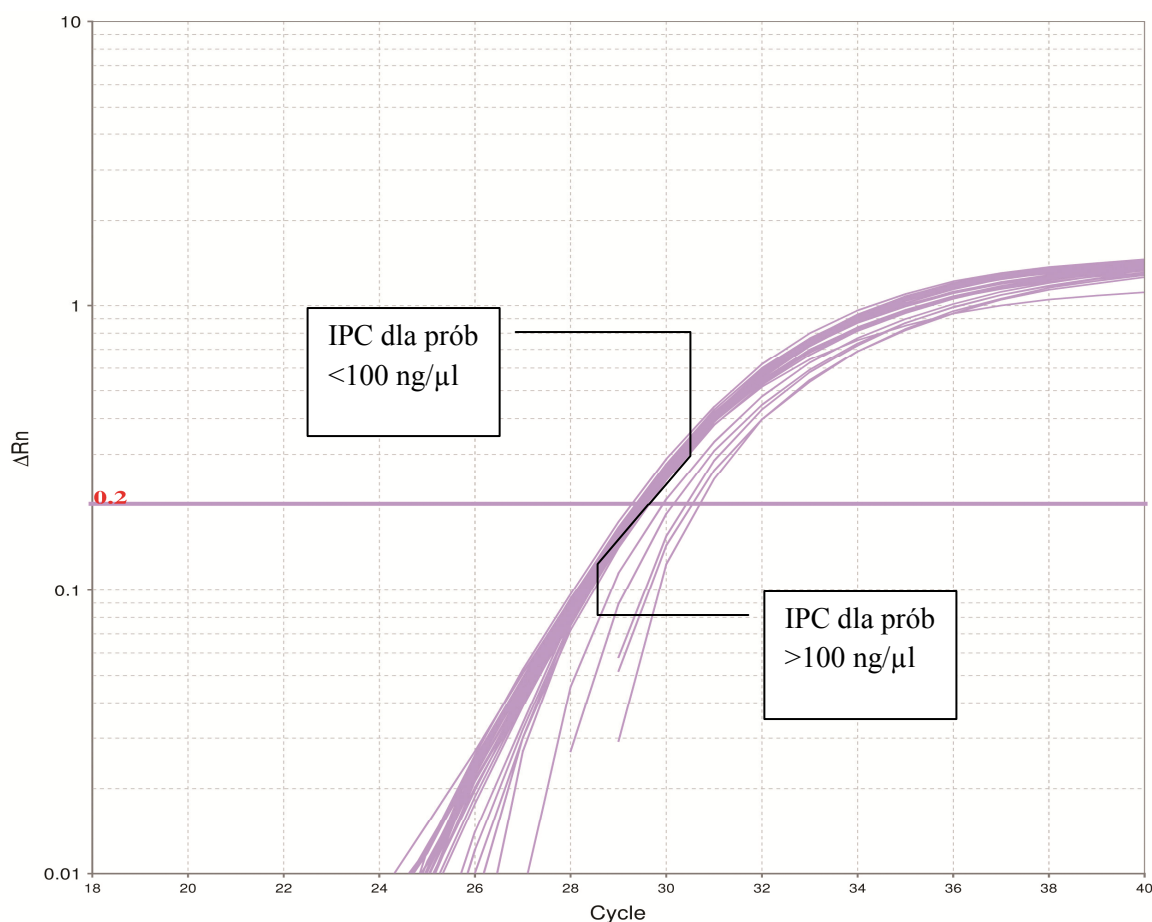
Rycina 7. Krzywa standardowa zależności wartości cyklu C_t Duo Human i cyklu C_t Duo Male względem stężenia DNA wyrażona w skali liniowej.



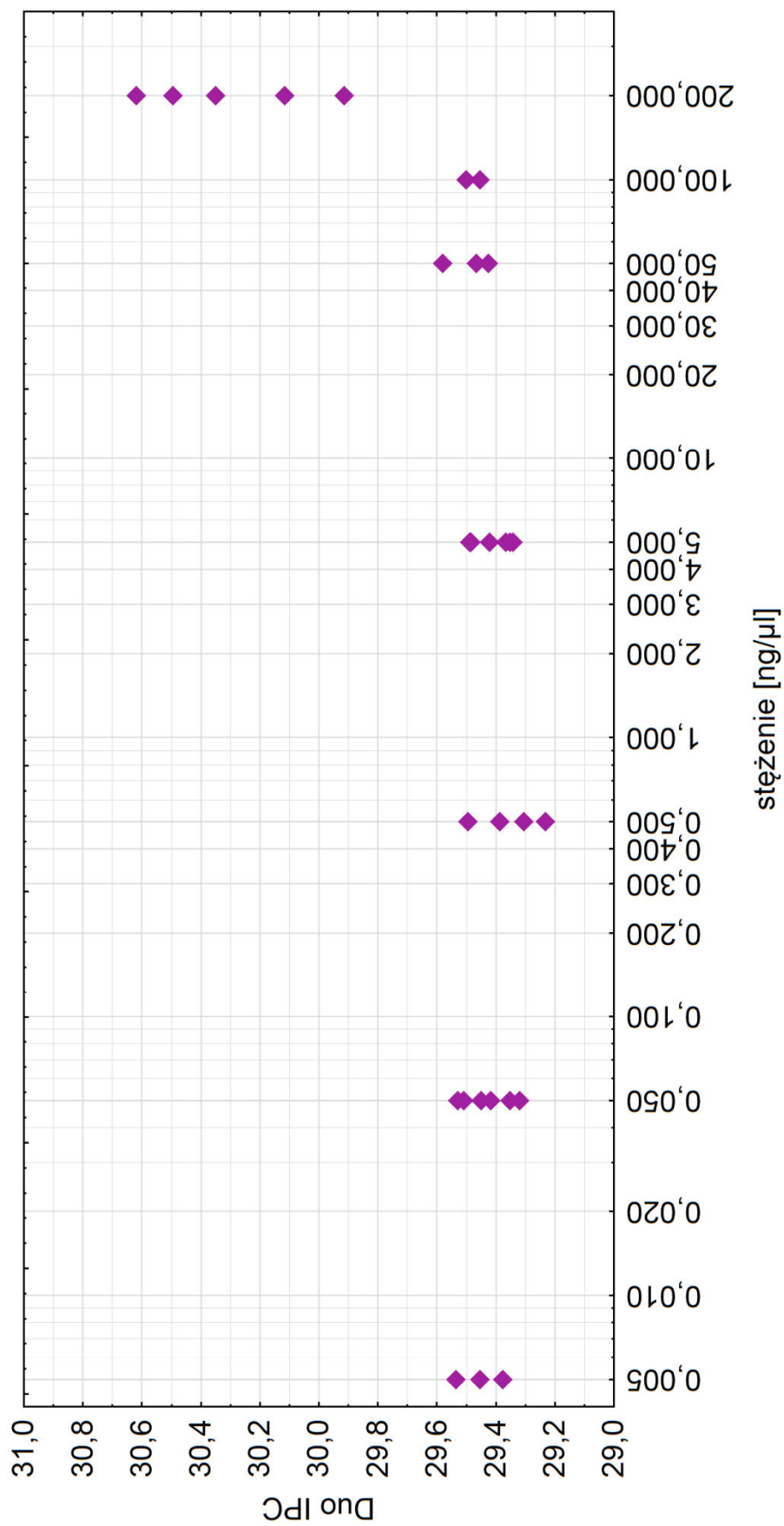
Rycina 8. Krzywa standardowa zależności wartości cyklu C_t Duo Human i cyklu C_t Duo Male względem stężenia DNA wyrażona w skali logarytmicznej.

Przeprowadzając oznaczenia rozcieńczeń standardu z zestawu Quantifiler Duo dokonano oceny wpływu stężenia DNA na wartość cyklu C_t dla IPC.

Na podstawie uzyskanych wyników przedstawionych w Załączniku nr 1 do niniejszej pracy oraz krzywych reakcji amplifikacji dla IPC można zauważyć, że dla stężeń mniejszych lub równych $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ C_t oscyluje w granicach 29 cyklu, natomiast dla stężeń wyższych wartość C_t przekracza 29. Tym niemniej mieści się ona w dopuszczalnym zakresie, poniżej akceptowanego 31 cyklu C_t . Zależność między obserwowaną wartością C_t , a wartościami IPC obrazują Ryciny 9 i 10.



Rycina 9. Wykres reakcji amplifikacji wskaźnika inhibicji (IPC) dla rozcieńczeń standardu w zakresie stężeń $0,005 \text{ ng}/\mu\text{l}$ – $200 \text{ ng}/\mu\text{l}$.



Rycina 10. Wykres zależności C_t wskaźnika inhibicji (IPC) od oznaczonego stężenia w badanych próbach z widoczną tendencją wzrostową cyklu C_t dla wysokich stężeń (zakres akceptowalny $C_t = 28 - 31$).

2. Ocena precyzji metody.

Ocena precyzji walidowanej metody obejmowała analizę jej powtarzalności i odtwarzalności.

Do analizy powtarzalności przeprowadzono sześć niezależnych pomiarów cyklu C_t dla dwóch rozcieńczeń standardu o stężeniach 5 ng/ μ l oraz 0,05 ng/ μ l, które uwzględniono w Załączniku nr 1. Dla otrzymanych wartości średnich wykonanych pomiarów obliczono wskaźniki SD (odchylenie standardowe) oraz CV (współczynnik zmienności), które zestawiono w Tabeli 4 .

Tabela 4. Ocena powtarzalności metody pomiaru stężenia DNA z wykorzystaniem zestawu Quantifiler Duo DNA Quantification Kit.

Próba: 5ng/ μ l				
Zmienna	N	\bar{x}	SD	CV
Duo Human	6	26,863	0,11	0,42%
Duo Male	6	27,701	0,13	0,48%
Duo IPC	6	29,410	0,07	0,22%
Próba: 0,05ng/ μ l				
Zmienna	N	\bar{x}	SD	CV
Duo Human	6	33,354	0,18	0,54%
Duo Male	6	34,383	0,30	0,88%
Duo IPC	6	29,430	0,08	0,28%

N – liczba oznaczeń, \bar{x} – wartość średnia, SD – odchylenie standardowe, CV – współczynnik zmienności

Dla każdej z prób uzyskano wartości CV poniżej 1%, co wskazuje na bardzo dobrą powtarzalność uzyskanych pomiarów.

Do analizy odtwarzalności dokonano oceny zgodności pomiarów wykonywanych w kilkunastodniowym odstępie czasowym przez różne osoby dla próby o stężeniu 200 ng/ μ l, które uwzględniono w Załączniku nr 1.

Zestawienie średnich wartości C_t oraz ich statystyczną ocenę za pomocą testu t – Studenta oraz zgodności wariancji testu Levene'a przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Analiza odtwarzalności wyników metodami statystycznymi.

Zmienna	Średnie C _t 13.03.2015	Średnie C _t 08.04.2015	test t-Studenta	df	Wartość P
Duo Human	21,961	21,570	1,354	8	0,2127
Duo Male	22,230	21,947	1,0286	8	0,3338
Duo IPC	30,022	30,299	-1,400	8	0,1990
Zmienna	SD 13.03.2015	SD 08.04.2015	test Levene'a	df	Wartość P Levene'a
Duo Human	0,55	0,34	1,681	8	0,2309
Duo Male	0,57	0,24	4,433	8	0,0684
Duo IPC	0,34	0,29	0,693	8	0,4294

SD – odchylenie standardowe, df – liczba stopni swobody,
P – wartość prawdopodobieństwa oceniającego statystyczną istotność różnic

Uzyskane wartości prawdopodobieństwa powyżej poziomu istotności 0,05 wskazują, że zarówno w przypadku parametru średnich wyników dla testu t – Studenta, jak i dla parametru wariancji w teście Levene'a obie porównywane grupy nie różnią się od siebie w istotny statystycznie sposób. Świadczy to o przeprowadzeniu oznaczeń w obu dniach pomiarowych w sposób odtwarzalny.

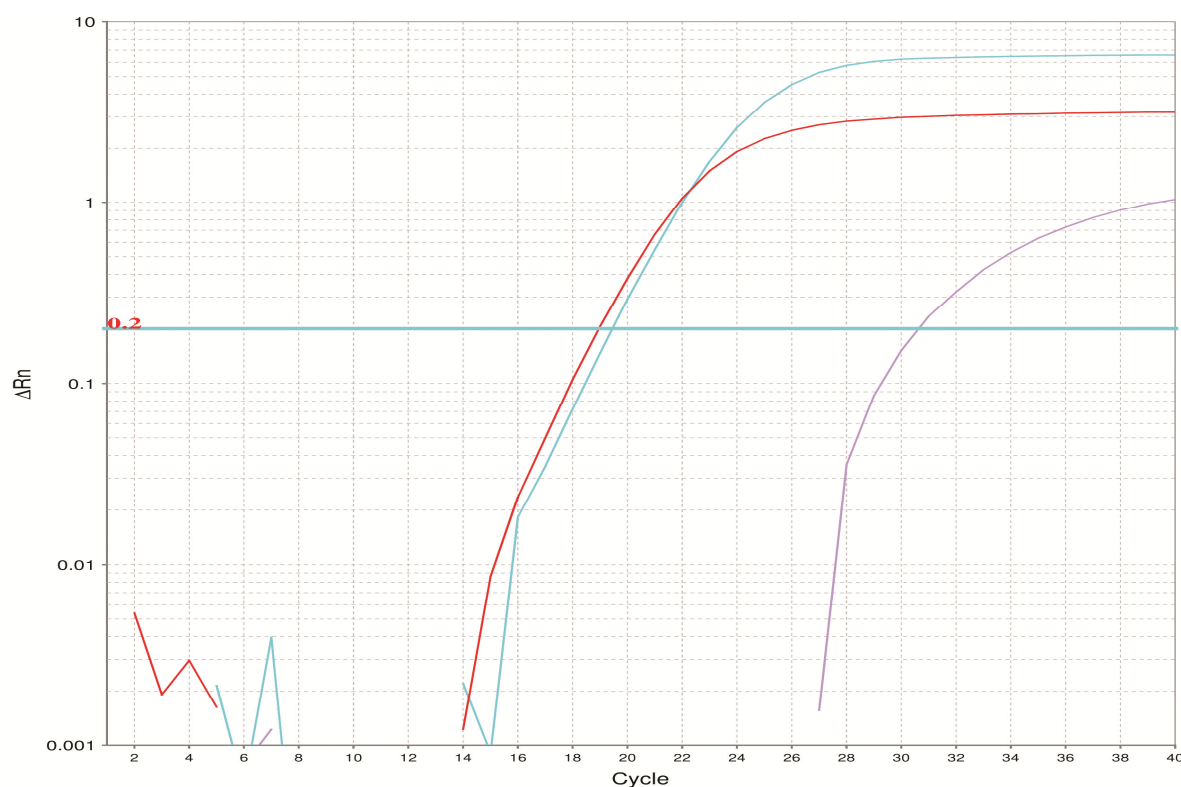
3. Oznaczenie prób o charakterze dowodowym.

Analizując wyniki uzyskane dla pomiarów prób o charakterze dowodowym, które zawarto w Załączniku nr 2 można zaobserwować, że dla próby 7.18, której wykres reakcji amplifikacji przedstawiono na Rycinie 11, odnotowano maksymalne stężenie DNA. Drugą z kolei próbą o najwyższym stężeniu DNA była próba 2.24. Stężenie ludzkiego DNA wyniosło dla tych dwóch prób kolejno 1317,355 ng/μl oraz 871,201 ng/μl. Stężenie męskiego DNA było równe odpowiednio 1322,924 ng/μl i 931,632 ng/μl. Zarówno dla próby 7.18 i 2.24 wartość IPC nie przekroczyła dopuszczalnego 31 cyklu C_t, choć dla próby 2.24 uzyskano wynik bliski tej wartości, tj. 30,965. Uzyskane wartości pomiarów IPC dla wszystkich prób świadczą o tym, że wysokie stężenie DNA nie zaburzą istotnie wskaźnika inhibicji.

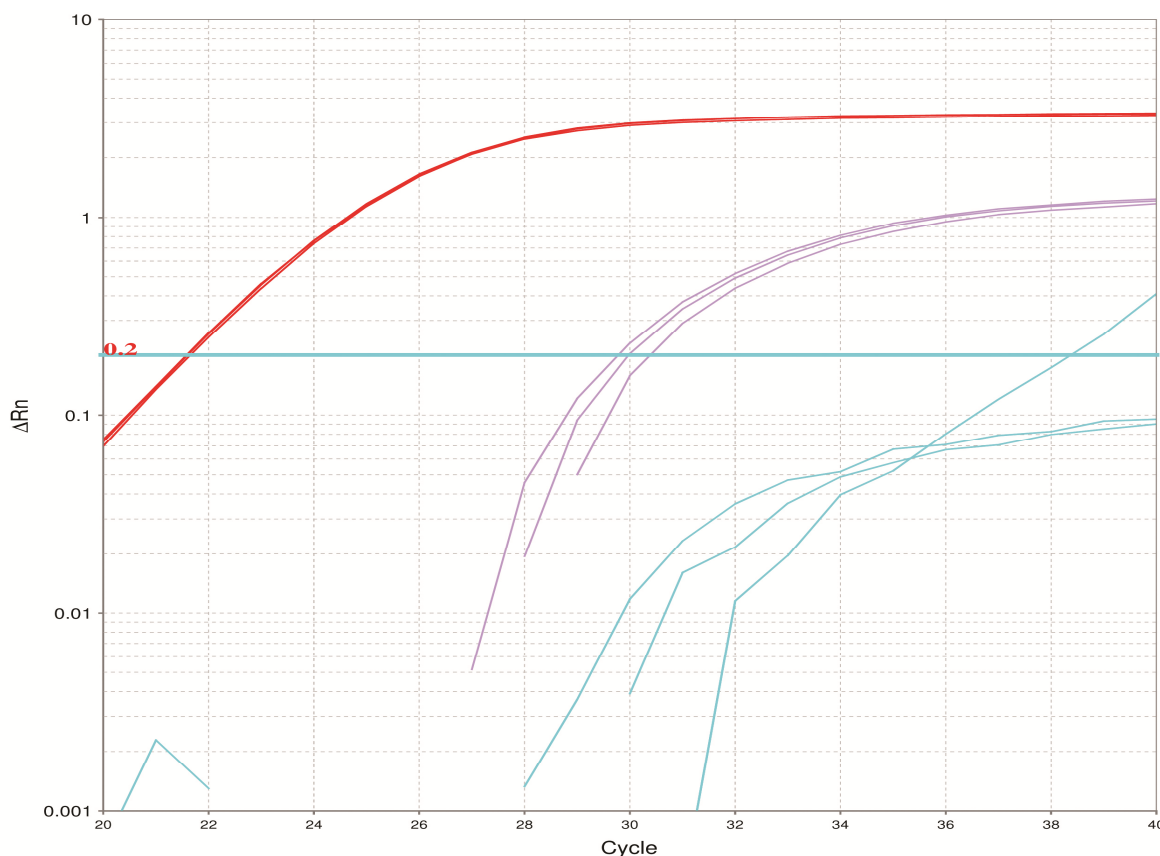
Bardzo interesująca okazała się analiza wyników pomiarów pod względem minimalnego stężenia DNA męskiego wykrywanego za pomocą metody real – time PCR. Dla prób 1.4, 1.10, P74K15 zaobserwowano detekcję Duo Male o najniższym

odczytanie stężenia, w przedziale: 0,004 – 0,02 ng/μl. Na poziomie 0,01 ng/μl możliwa okazała się jeszcze detekcja z zachowaniem precyzji uzyskanych wyników. Dla próby dowodowej P74K15 o stężeniu 0,004 ng/μl zaobserwowano efekt stochastyczny związany z brakiem detekcji śladowej ilości męskiego DNA w dwóch na cztery wykonane pomiary. Podobnych obserwacji dokonano analizując wyniki pomiarów dla rozcieńczeń standardu z zestawu Quantifiler Duo. Dla stężeń śladowych 0,004 i 0,005 ng/μl nastąpił brak detekcji męskiego DNA w części lub we wszystkich przeprowadzonych oznaczeniach (Załącznik nr 1).

Z uzyskanych wyników dla prób stanowiących mieszaniny DNA dokonano detekcji męskiej komponenty na progu jej wykrywalności dla prób 1.4, 1.10, 1.24, 3.30. Najniższy odsetek męskiego DNA ujawniony w mieszaninie z żeńskim wynosił 0,002% dla próby P74K15, której wykres reakcji amplifikacji przedstawiono na Rycinie 12. Pozwolił on na detekcję dwóch komórek męskich przy obecności 100 000 komórek żeńskich, co świadczy o ekstremalnie wysokiej czułości metody.



Rycina 11. Wykres reakcji amplifikacji dla próby 7.18, dla której odnotowano najwyższe stężenie ludzkiego DNA oraz męskiego DNA.



Rycina 12. Wykres reakcji amplifikacji dla próby P74 K15, dla której odnotowano najniższy próg detekcji męskiego DNA występującego w mieszaninie z żeńskim i towarzyszący mu efekt stochastyczny.

4. Porównanie oznaczeń uzyskanych metodą real – time PCR z innymi technikami pomiarowymi.

4.1. Porównanie pomiarów stężeń prób kontrolnych.

W celu porównania średnich wartości uzyskanych pomiarów stężeń materiałów kontrolnych K1 – K7 w stosunku do stężeń podanych przez producenta zastosowano test t – Studenta do oceny istotności różnic. Wyniki przeprowadzonej analizy statystycznej przedstawiono w Tabeli 6. Szczegółowe zestawienie przeprowadzonych pomiarów zawarto w Załączniku nr 3.

Tabela 6. Analiza statystyczna porównująca uzyskane pomiary stężeń prób kontrolnych z ich stężeniami DNA podanymi przez producenta.

Kontrola	Zmienna	N	\bar{x}	SD	t	df	P
K1 XY 0,1ng/ μ l	Duo Human	6	0,096	0,026665	-0,40175	5	0,704467
	Duo Male	6	0,102	0,022929	0,19448	5	0,853458
K2 XY 2 ng/ μ l	Duo Human	6	0,997	0,371808	-6,60679	5	0,001950
	Duo Male	6	1,126	0,333910	-6,40948	5	0,001371
K3 XY 2 ng/ μ l	Duo Human	4	1,652	0,232832	-2,98956	3	0,058151
	Duo Male	4	1,615	0,227680	-3,38457	3	0,042946
K4 XY 0,1 ng/ μ l	Duo Human	4	0,068	0,009246	-6,88775	3	0,006269
	Duo Male	4	0,077	0,025445	-1,79655	3	0,170268
K5 XX 0,1 ng/ μ l	Duo Human	6	0,091	0,012814	-1,73621	5	0,143042
	Duo Male	-	-	-	-	-	-
K6 XX 10 ng/ μ l	Duo Human	4	10,614	3,901516	0,31465	3	0,773639
	Duo Male	-	-	-	-	-	-
K7 XX 0,1 ng/ μ l	Duo Human	4	0,089	0,031601	-0,72288	3	0,522012
	Duo Male	-	-	-	-	-	-

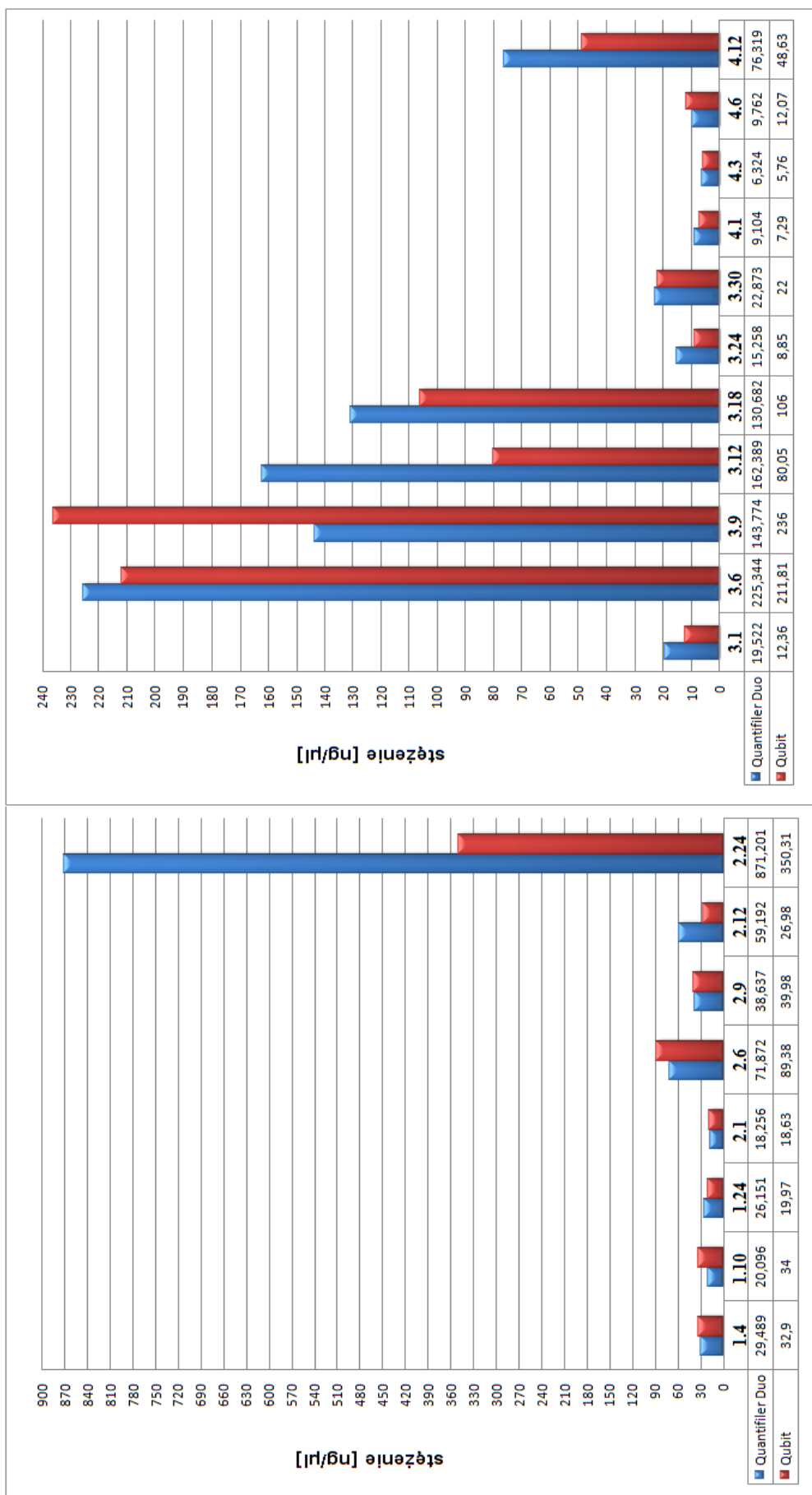
N – liczba oznaczeń, \bar{x} – wartość średnia, SD – odchylenie standardowe, t – wartość testu t – Studenta, df – liczba stopni swobody, P – wartość prawdopodobieństwa oceniającego statystyczną istotność różnic (kolorem czerwonym oznaczono wartości prawdopodobieństwa wskazujące na statystycznie istotne różnice)

Uzyskane wartości prawdopodobieństwa wskazują na istotne statystycznie różnice między uzyskanymi wartościami stężeń sekwencji autosomalnej dla kontroli K2 i K4 oraz sekwencji chromosomu Y dla kontroli K2 i K3, a wartościami stężeń podanymi przez producenta. Pozostałe wyznaczone stężenia dla materiałów kontrolnych nie różnią się w sposób statystycznie istotny względem stężeń podanych. Najbardziej zbliżony zakres stężenia podanego przez producenta w zestawieniu z pomiarami uzyskanymi z wykorzystaniem metody real – time PCR obserwujemy dla próby kontrolnej K1 oraz K6.

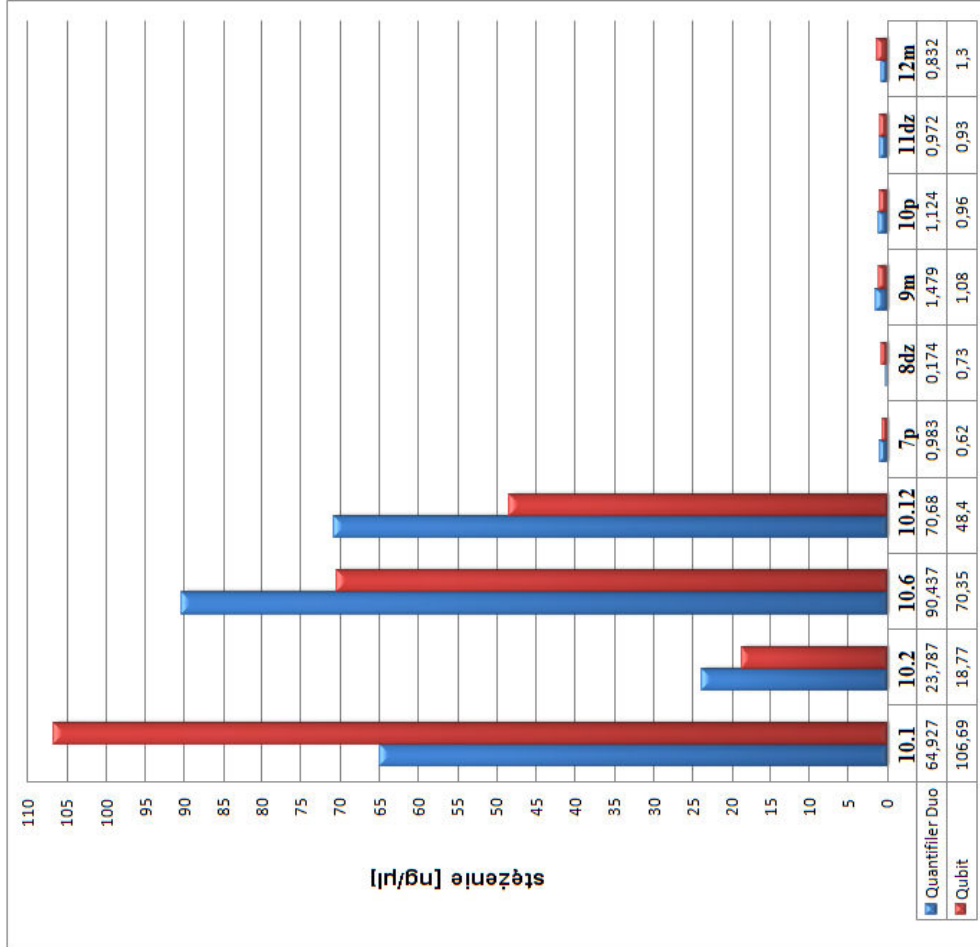
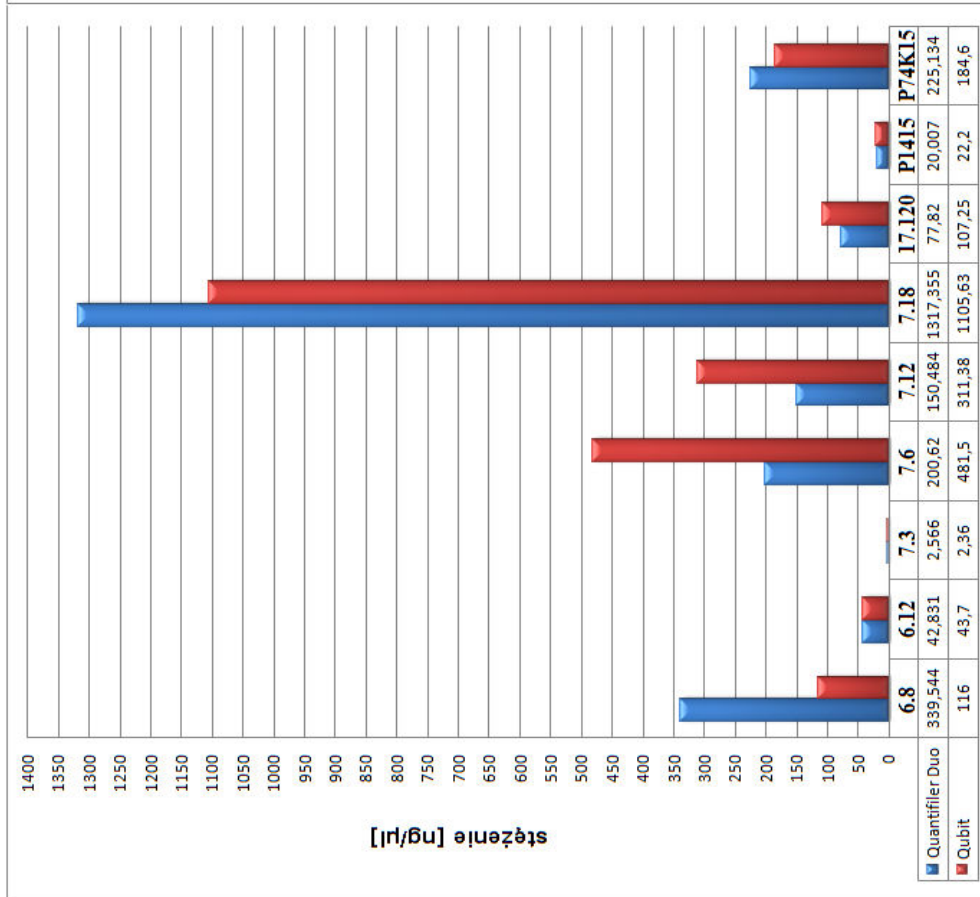
4.2. Porównanie pomiarów stężenia DNA z pomiarami fluorymetrycznymi.

Ze względu na brak selektywności metody fluorymetrycznej analiza wyników opierała się na porównaniu stężeń ludzkiego autosomalnego DNA uzyskanych za pomocą techniki real – time PCR z całkowitym stężeniem DNA oznaczonym z wykorzystaniem metody fluorymetrycznej. Do analizy wykorzystano 38 prób. Dla 20 prób (52,63%) stężenie DNA było wyższe dla zestawu Quantifiler Duo, 12 prób (31,58%) cechowało się wyższym stężeniem oznaczonym metodą fluorymetryczną,

natomiast 6 prób (15,79%) miało podobne stężenie w obu metodach. Graficzne porównanie stężeń uzyskanych za pomocą obu technik pomiarowych przedstawiono na Rycinach 13 i 14, które umieszczono na kolejnych stronach. Analiza wyników wskazuje na to, iż obie techniki pomiarowe dają w większości nieporównywalne rezultaty. Największe różnice zaobserwowano przy zestawieniu najwyższych pomiarów stężeń, przekraczających 100 ng/μl.



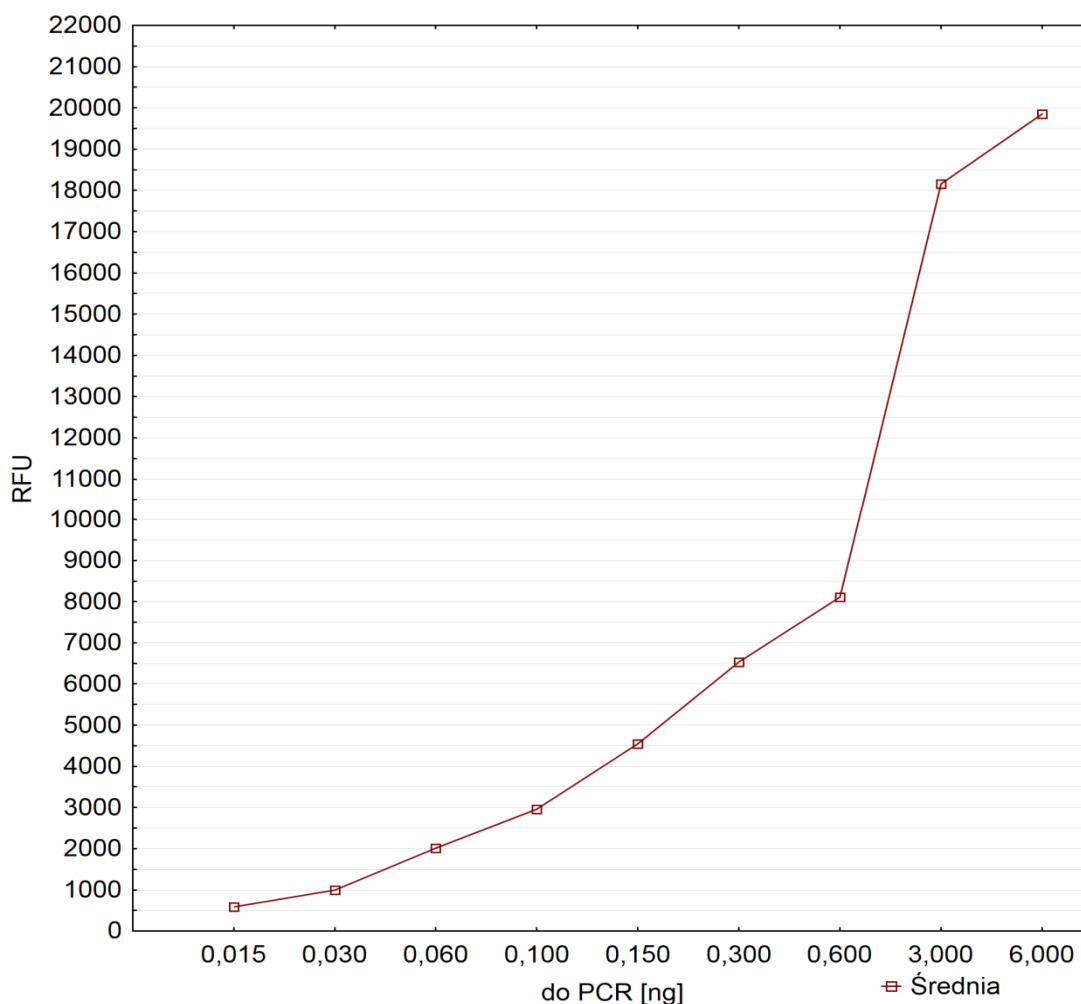
Rycina 13. Porównanie wyników pomiaru stężeń DNA – metodą real – time PCR (Quantifiler Duo DNA Quantification Kit) oraz fluorymetryczną (Quant – iT HS dsDNA Kit).



Rycina 14. Porównanie wyników pomiaru stężenia DNA – metodą real – time PCR (Quantifiler Duo DNA Quantification Kit) oraz fluorymetryczną (Quant – iT HS dsDNA Kit).

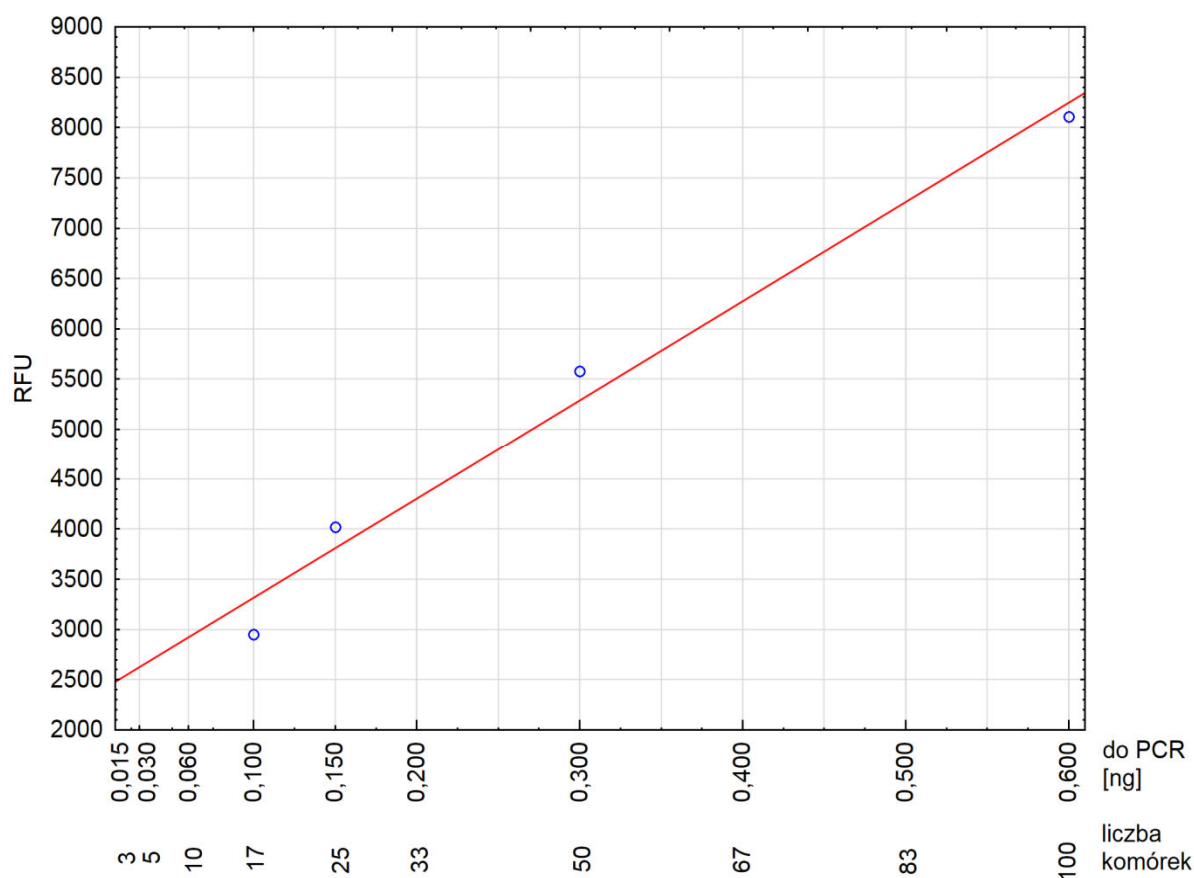
4.3. Określenie zależności między ilością DNA użytą w reakcji PCR a średnią wartością RFU.

Do oceny zależności uzyskanego stężenia DNA od wartości RFU wykorzystano kontrole K1, K2, K5 i ich rozcieńczenia. Zależność tą oceniono w oparciu o wyniki zawarte w Załączniku nr 4. Na Rycinie 15 przedstawiającej zależność średniej wartości RFU względem wsadowej ilości DNA użytej do reakcji PCR można zaobserwować proporcjonalny wzrost wartości RFU w zakresie 0,015 – 0,6 ng. Zależność średniej wartości RFU względem ilości matrycowego DNA przybiera postać zbliżoną do liniowej dla ilości 0,1ng – 0,6 ng DNA.



Rycina 15. Zestawienie średnich wysokości sygnału (RFU) z ilością DNA użytą do reakcji PCR.

Dla zakresu 0,1 – 0,6 ng ilości DNA dodanej do reakcji PCR sporządzono wykres liniowej zależności, który przedstawiono na Rycinie 16.



Rycina 16. Wykres zależności średnich wysokości alleli (poziom RFU) od ilości DNA oraz przybliżonej liczby komórek, które poddano reakcji amplifikacji.

Wartość odczytanego z krzywej współczynnika R^2 wyniosła 0,9813. Potwierdza to wysoką korelację ilości DNA (liczby komórek) dodanych do reakcji PCR względem wartości RFU. Analiza uzyskanych elektroforegramów wskazuje na to, że ilość DNA w przedziale 0,1 – 0,6 ng stanowi optymalną wsadową ilość DNA do reakcji PCR, która skutkuje uzyskaniem pełnych, dobrze zbalansowanych heterozygot oraz łatwych w interpretacji profili DNA.

Poniżej dolnego zakresu liniowości – dla 0,015 ng DNA użytego do reakcji PCR zaobserwowano zjawisko wypadania alleli (ang. drop – out) związane ze zbyt małą ilością DNA wykorzystaną do reakcji amplifikacji. Najniższa ilość DNA dodana do

reakcji PCR, która pozwoliła na uzyskanie pełnego profilu STR stanowiła 0,03 ng, tj. około 5 diploidalnych komórek.

Przy zastosowaniu większej niż optymalnej ilości wsadowej DNA do reakcji PCR, wynoszącej 3 ng i 6 ng dokonano odczytu średniej wysokości alleli produktów przekraczających 18 000 RFU, co wskazuje na nadmierną amplifikację. Nadmiar DNA skutkowało obserwowaniem zjawiska częściowej adenylacji oraz pojawieniem się artefaktów amplifikacji ograniczających możliwość prawidłowej interpretacji uzyskanych profili DNA. Pozwala to na wyciągnięcie wniosku, że ilość DNA użyta do reakcji multipleks PCR przekraczająca 3 ng stanowi zbyt dużą ilość DNA zastosowaną do PCR. Dla takiej ilości uzyskiwane wyniki nie są czytelne, a tym samym mniej wiarygodne.

V. Dyskusja

Kluczowym etapem analizy DNA jest pomiar stężenia materiału genetycznego. Metoda real – time PCR stanowi jedną z najczulszych technik umożliwiających analizę jakościową i ilościową DNA. Zestaw Quantifiler Duo DNA Quantification Kit, jako aplikacja metody real – time PCR z zastosowaniem sond TaqMan umożliwia wykrycie sekwencji ludzkiego i męskiego DNA, a także inhibitorów, które mogą hamować reakcję amplifikacji. Ze względu na selektywną detekcję określonych sekwencji DNA zestaw ten jest szczególnie przydatny do analizy materiałów stanowiących mieszaniny DNA.

Jako cel niniejszej pracy obrano walidację wewnętrzną zestawu Quantifiler Duo DNA Quantification Kit z zastosowaniem aparatu 7500 Real – Time PCR System.

Zgodnie z wymogami producenta – firmy Applied Biosystems, przy każdorazowym przeprowadzaniu oznaczenia zalecane jest sporządzenie krzywej standardowej zależności cyklu C_t względem stężenia dla Duo Human i Duo Male, która ma obejmować dwukrotny pomiar 8 stężeń w zakresie 50 – 0,023 ng/ μ l [4]. Mając na uwadze znaczący wpływ słabej precyzji pipetowania przy każdorazowym sporządzaniu rozcieńczeń standardu na jakość uzyskiwanej krzywej, Grgicak i wsp. [19] zalecają stworzenie własnej krzywej standardowej w toku procedury walidacyjnej. W niniejszej pracy krzywe sporządzono w oparciu o pomiary dla rozcieńczeń standardu z zestawu Quantifiler Duo. Zakres zastosowanych stężeń obejmował 5 rzędów wielkości: 0,005 – 200 ng/ μ l w porównaniu do 3 rzędów wielkości zalecanych przez producenta. Tak szeroki zakres analizowanych wartości ma związek z możliwością zastosowania zestawu nie tylko dla celów genetyczno – sądowych, ale także, jako badanie monitorujące stan chimeryzmu DNA i jego zmian u pacjentów po allogenicznym przeszczepie komórek macierzystych hematopoezy, gdy dawca i biorca są odmienni płciowo [26].

W uzyskanych pomiarach wartości cyklu C_t dla sekwencji autosomalnej osiągały z reguły niższe wartości niż cyklu C_t dla sekwencji chromosomu Y. Ma to związek

z haploidalnym charakterem genu SRY w stosunku do diploidalnego genu RPPH1. Ze względu na podwójną zawartość kopii autosomalnego genu w materiale badanym potrzebna jest mniejsza liczba cykli reakcji amplifikacji, aby przekroczyć wartość progową w porównaniu do sekwencji genu SRY. Haploidalny charakter sekwencji męskiego DNA ma także wpływ na słabszą wydajność reakcji powielenia ampliconu, związany jest też z niższą wartością współczynnika R^2 oraz może skutkować wystąpieniem efektu stochastycznego w zakresie niskich stężeń. Dla sekwencji męskiej zarówno wartość współczynnika R^2 jak i wydajność reakcji były niższe w stosunku do powielanej sekwencji autosomalnej [4,6]. Mimo to, mieściły się one na akceptowalnym, dobrym poziomie.

Zastosowanie wskaźnika inhibicji (IPC) daje możliwość detekcji inhibitorów w oparciu o wzrastającą wartość C_t dla IPC. Jak podaje producent, wzrost C_t dla IPC można także obserwować przy dużym stężeniu DNA obecnym w próbce, co jest wynikiem kompetycji DNA badanego i materiału stanowiącego IPC o substraty reakcji PCR [4]. W związku z tym interpretacja przyczyny przesunięcia wartości C_t dla IPC może okazać się niejednoznaczna. Spośród analizowanych w niniejszej pracy stężeń DNA standardu jak i wysokich stężeń prób o charakterze dowodowym wzrost C_t dla IPC nie przekroczył górnego, akceptowalnego poziomu. W związku z tym można wysnuć wniosek, że wysokie stężenie DNA w próbce nie wpływa na zmniejszenie wydajności amplifikacji IPC. Dzięki temu mamy gwarancję wiarygodnych oznaczeń dla bardzo szerokiego zakresu stężeń.

Jednym z podstawowych parametrów ocenianych w procedurze walidacyjnej metod badawczych stosowanych w laboratorium jest ocena precyzji w zakresie powtarzalności i odtwarzalności [16,50]. Wykonywanie pomiarów w sposób precyzyjny jest warunkiem koniecznym dopuszczenia walidowanej techniki pomiarowej do rutynowych oznaczeń. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że zestaw Quantifiler Duo wykazuje wysoką powtarzalność i odtwarzalność pomiarów.

Dyskusyjną kwestią jest określenie czułości systemu Quantifiler Duo. Według walidacji przeprowadzonej przez producenta wiarygodność i powtarzalność dla niskich stężeń DNA ogranicza się do 0,023 ng/ μ l [4]. Z badań przeprowadzonych przez Barbisin i wsp. [6] wynika, że wyniki powtarzalne uzyskano na poziomie 0,0115 ng/ μ l. W niniejszej pracy wartości pomiarów rozcieńczeń standardu i prób o charakterze dowodowym pozwoliły wykazać, że już począwszy od 0,01 ng/ μ l można uzyskać powtarzalne wyniki. Poniżej 10 pg DNA możliwa jest detekcja zarówno sekwencji autosomalnego i SRY, jednakże dochodzi do utraty precyzji oznaczeń i wystąpienia wyników fałszywie ujemnych.

Quantifiler Duo umożliwia detekcję i pomiar stężenia DNA ludzkiego i męskiego w próbach stanowiących mieszaniny DNA. Ważne jest, aby detekcja komponenty męskiej odbywała się z wysoką czułością. W procedurze walidacyjnej prowadzonej przez producenta maksymalnym analizowanym stosunkiem DNA męskiego do żeńskiego była wartość 1:1000. Istnieją doniesienia mówiące o tym, że metoda ta daje możliwość detekcji męskiego DNA nawet przy 10 000 – krotnym nadmiarze DNA żeńskiego [5]. W przeprowadzonych badaniach z powodzeniem dokonano detekcji dwóch komórek męskich na 100 000 żeńskich, co świadczy o ekstremalnie wysokiej czułości walidowanej metody, wyższej niż udokumentowanej dotychczas.

Powszechnie stosowaną metodą do pomiaru stężenia DNA jest metoda fluorymetryczna z wykorzystaniem aparatu Qubit Fluorometer firmy Invitrogen. W porównaniu do metody real – time PCR nie daje możliwości selektywnego oznaczenia ludzkiego i męskiego DNA. Zestawiając ze sobą wyniki uzyskane dla tych samych prób wnioskujemy, że pomiary fluorymetryczne nie dają kompatybilnych odczytów w stosunku do pomiarów techniką real – time, co szczególnie jest widoczne dla wysokich stężeń powyżej 100 ng/ μ l.

Real – time PCR jako bardzo czuła metoda została włączona do procesu profilowania DNA w celu oceny stężenia materiału genetycznego. Paradoksalnie, wysoka czułość tej metody stanowi jej ograniczenie. Technika ta przy oznaczeniach przeprowadzonych dla prób o bardzo niskim stężeniu DNA charakteryzuje się brakiem

powtarzalności. Możemy wtedy uzyskać wyniki fałszywie ujemne, wskazujące na brak DNA w próbce, podczas gdy technika multipleks PCR pozwala na uzyskanie pełnego profilu DNA [33]. W związku z tym problematyczne jest ustalenie punktu odcięcia (ang. cut – off) dla stężenia DNA oznaczonego za pomocą real – time PCR, począwszy od którego nie jest już możliwe uzyskanie pełnego profilu [10]. Jako główny czynnik efektu stochastycznego uznaje się różne objętości stosowane do oznaczeń w metodach real – time PCR oraz multipleks PCR. Znaczący jest także błąd pipetowania, który jest większy dla objętości mniejszych. Kolejnym aspektem jest różnica w stosowanych odczynnikach, zarówno, jeśli chodzi o wykorzystaną polimerazę czy substancje odpowiedzialne za inaktywację inhibitorów. Obecność inhibitorów oraz stosowanych objętości prób ma także wpływ na koncentrację czynników hamujących reakcje amplifikacji. Nie bez znaczenia jest również wykorzystywanie różnych sekwenatorów, których czułości detekcji są często odmienne. W praktyce niekompatybilność między oznaczeniami metodą real – time a techniką multipleks PCR oraz efekt stochastyczny obrazują badania na szczątkach ludzkich ekshumowanych na terenie byłego poligonu na Brusie, które wykonywane były w Pracowni Genetyki Medycznej i Sądowej Katedry i ZMS UM w Łodzi. W przeprowadzonej analizie genetycznej dla kilku prób nie dokonano detekcji autosomalnego DNA za pomocą zestawu Quantifiler Duo, natomiast dla niektórych z nich uzyskano całkowity bądź częściowy profil markerów STR [15]. W badaniach do niniejszej pracy zaobserwowano efekt stochastyczny związany z wypadaniem alleli dla ilości DNA 0,015 ng użytej do amplifikacji. Począwszy od 0,030 ng wsadowej uzyskano pełen profil STR. W oparciu o uzyskane wyniki punkt odcięcia, dla którego otrzymuje się pełen profil DNA w Pracowni Genetyki Medycznej i Sądowej ZMS UM Łódź należy ustalić na poziomie 30 pg, co odpowiada 5 komórkom diploidalnym.

Butler [10] wskazuje na konieczność znalezienia korelacji między uzyskanymi pomiarami stężenia DNA w próbce badanej, a spodziewanymi wartościami średniej wysokości pików uzyskanych dla profilu STR. Istotna jest liniowość korelacji, która przedstawia wprost proporcjonalną zależność wartości RFU od DNA wykorzystanego do reakcji PCR. Wraz ze wzrostem stężenia DNA obserwuje się liniowy wzrost wartości sygnału fluorescencji, jednak tylko do pewnego momentu. Określany jest

on mianem limitu liniowości (ang. limit of linearity – LOL) – wartości, dla której pomimo zwiększającej się ilości materiału genetycznego nie obserwuje się dalej liniowego wzrostu sygnału [8]. Wśród badanych ilości DNA do reakcji amplifikacji liniową zależność obserwowano w przedziale 0,1 – 0,6 ng. W przeprowadzonych badaniach nie wyznaczono ścisłego LOL. Tym niemniej udokumentowano brak wiarygodnych wyników począwszy od ilości 3 ng DNA użytej do reakcji multipleks PCR.

Dobór optymalnej ilości DNA do reakcji amplifikacji pozwala na uniknięcie artefaktów będących źródłem błędów interpretacyjnych uzyskanego profilu DNA. Zakresy ilości DNA, które są zalecane dla poszczególnych zestawów PCR nie są w pełni zbieżne [6,30]. Dla AmpF ℓ STR NGM PCR Amplification Kit, który został wykorzystany do badań w niniejszej pracy, zalecaną ilością wsadową jest 1 ng w objętości 10 μ l dodanych do reakcji PCR [2]. W przeprowadzonych oznaczeniach wykazano, że optymalnym zakresem ilości DNA jest 0,1 – 0,6 ng. Najprawdopodobniej jest to związane z przeprowadzeniem oznaczeń na AB 3500 Genetic Analyzer, który jest obecnie najczulszym sekwenatorem kapilarnym używanym do analiz genetyczno – sądowych.

Proces profilowania DNA wymaga walidacji, celem określenia, dla jakich wartości stężeń i ilości DNA w próbce oznaczanych w oparciu o określoną aparaturę badawczą i metodykę stosowaną w danym laboratorium uzyskuje się wiarygodne wyniki. Dodanie nieoptymalnej, zbyt dużej ilości matrycowego DNA powoduje nadmierną amplifikację próbki, z czym wiąże się zbyt duża liczba pików artefaktowych. Ponadto można wtedy zaobserwować zjawisko częściowej adenylacji bądź całkowitego braku odczytu. Występujące stuttery o stosunkowo wysokiej wartości RFU mogą zostać potraktowane błędnie jako allele pochodzące z próby [13].

Zastosowanie z kolei zbyt niskich ilości DNA do analizy może spowodować wypadanie alleli lub pojawienie się przypadkowych alleli (ang. drop – out, drop – in), charakterystycznych dla efektu stochastycznego, mogącego również wpływać na błędną interpretację profilu DNA.

VI. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań, których celem była walidacja systemu Quantifiler Duo DNA Quantification Kit można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Uzyskane krzywe standardowe zależności cyklu C_t względem stężenia DNA ludzkiego i męskiego DNA spełniają wymagania dotyczące liniowości oraz wydajności reakcji w pełnym zakresie stężeń standardu, tj. 0,005 – 200 ng/ μ l.
2. Wszystkie przeprowadzone pomiary dla wskaźnika inhibicji mieściły się w akceptowalnych granicach 28 – 31 cyklu C_t , co daje gwarancję wiarygodnych oznaczeń z użyciem walidowanego zestawu dla szerokiego zakresu pomiarowego.
3. Metoda jest powtarzalna i odtwarzalna, co świadczy o jej precyzji pomiarowej.
4. Wykazano, że minimalnym stężeniem DNA warunkującym precyzję oznaczeń jest 0,01 ng/ μ l. Metoda jest wysoce czuła i pozwala na detekcję 1 komórki męskiej przypadającej na 50 000 komórek żeńskich.
5. Porównanie oznaczonych stężeń dla prób kontrolnych ze stężeniami podanymi przez producenta wykazało brak statystycznej istotności różnic we wszystkich pomiarach dla kontroli K1, K5, K6, K7, natomiast statystycznie znamienne różnice uzyskano dla niektórych pomiarów kontroli K2, K3, K4.
6. Uzyskane pomiary stężeń DNA przeprowadzone techniką real – time PCR oraz metodą fluorymetryczną nie są względem siebie kompatybilne, szczególnie dla wysokich wartości stężeń >100 ng/ μ l.
7. Optymalna ilość DNA do reakcji amplifikacji obejmuje zakres 0,1 – 0,6 ng i przekłada się na liniową zależność z parametrem RFU oznaczonym z użyciem techniki kapilarnego rozdziału elektroforetycznego.

VII. Streszczenie

Kluczowym etapem w analizie genetyczno – sądowej materiału dowodowego prowadzącej do uzyskania łatwego w interpretacji profilu DNA jest detekcja materiału genetycznego i precyzyjna jego ocena ilościowa i jakościowa. Metoda analizy real – time PCR w oparciu o oznaczenia z zastosowaniem systemu Quantifiler Duo DNA Quantification Kit firmy Applied Biosystems daje możliwość selektywnego pomiaru stężenia ludzkiego oraz męskiego DNA, co jest bardzo istotne w analizie mieszanin DNA. Umożliwia też detekcję inhibitorów, które hamują amplifikację DNA w stosowanych metodach badawczych w laboratoriach genetyczno – sądowych.

Każda metoda, która ma znaleźć zastosowanie w rutynowych oznaczeniach laboratoryjnych wymaga przeprowadzenia procedury walidacyjnej. Dlatego też celem niniejszej pracy było wykonanie walidacji wewnętrznej wyżej wymienionej metody analizy DNA.

Na podstawie przeprowadzonych oznaczeń stwierdzono, że walidowany zestaw spełnia założone kryterium akceptacji liniowości i wydajności w pełnym zakresie oznaczanych stężeń. Wyniki, które posłużyły do oceny powtarzalności i odtwarzalności wskazują, iż walidowany system Quantifiler Duo jest precyzyjny. Dolna granica odczytu, powyżej której zachowana jest precyzja oznaczeń wynosi 0,01 ng/μl. Wykazano ekstremalnie wysoką czułość metody. Pozwala ona na wykrycie mniejszego komponentu stanowiącego 0,002% mieszaniny. Wysokie wartości stężeń nie zaburzają odczytu dla wskaźnika inhibicji, co umożliwia przeprowadzenie wiarygodnych pomiarów dla szerokiego zakresu stężeń przekraczających 200 ng/μl. Porównując stężenia materiałów kontrolnych podanych przez producenta z przeprowadzonymi pomiarami stwierdzono brak statystycznej istotności różnic dla 4 z 7 badanych prób kontrolnych. Uzyskane pomiary stężeń DNA za pomocą techniki real – time PCR i metody fluorymetrycznej nie są względem siebie kompatybilne, szczególnie dla wysokich wartości stężeń powyżej 100 ng/μl. Optymalna ilość DNA do reakcji amplifikacji obejmuje zakres 0,1 – 0,6 ng i przekłada się na liniową zależność z parametrem RFU.

VIII. Piśmiennictwo

1. Alaeddini R. Forensic implications of PCR inhibition – A review. *Forensic Science International: Genetics*. 2012, 6, 297-305
2. Applied Biosystems. AmpF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ NGM TM PCR Amplification Kit. User guide. USA, 2015, 4425511 Rev. G: 15
3. Applied Biosystems. Real – time PCR: Understanding C $_t$. Application note. Real – time PCR. USA, 2011, CO 16926 0211
4. Applied Biosystems. Quantifiler $\text{\textcircled{R}}$ Duo DNA Quantification Kit. User's manual. USA, 2008, 4391294 Rev. A
5. Barbisin M., Fang R., Furtado M.R., Shewale J.G. Quantifiler $\text{\textcircled{R}}$ Duo DNA Quantification Kit: A guiding tool for Short Tandem Repeat genotyping of forensic samples. *Journal of Forensic Research*. 2011, 2, 118
6. Barbisin M., Fang R., O'Shea C.E., Calandro L.M., Furtado M.R., Shewale J.G. Developmental validation of Quantifiler $\text{\textcircled{R}}$ Duo DNA Quantification Kit for simultaneous quantification of total human and human male DNA and detection of PCR inhibitors in biological samples. *Journal of Forensic Science*. 2009, 54, 305-319
7. Branicki W., Kupiec T., Wolańska - Nowak P. *Badania DNA dla celów sądowych*. Kraków 2008, Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych
8. Brągoszewska A., Zbieć - Piekarska R. Wskazówki do walidacji wewnętrznej multipleksowych zestawów STR. *Problemy Kryminalistyki*. 2012, 276, 32-38
9. Bregu J., Conklin D., Coronado E., Terrill M., Cotton R., Grgicak M. Analytical Thresholds and sensitivity: Establishing RFU Thresholds for Forensic DNA Analysis. *Journal of Forensic Science*. 2013, 58, 120-129
10. Butler J.M. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. USA 2011, Elsevier Academic Press
11. Butler J.M. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *Journal of Forensic Science*. 2006, 51, 253-265

12. Chamberlain J.S., Gibbs R.A., Ranier J.E., Nguyen P.N., Caskey C.T. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*. 1988, 16, 11141-11156
13. Dąbrowska J., Makowska Ż., Spólnicka M., Szablowska - Gnap E. Najczęstsze zjawiska występujące podczas analizy profili DNA w multipleksowych systemach STR. *Problemy Kryminalistyki*. 2013, 279, 46-53
14. Dąbrowska J., Makowska Ż., Spólnicka M., Szablowska - Gnap E. Teoretyczne podstawy analizy mieszaniny DNA w multipleksowych systemach STR. *Problemy Kryminalistyki*. 2013, 280, 16-27
15. Dębska E., Nowakowski P.A., Jacewicz R., Bąbol - Pokora K, Prośniak A., Jędrzejczyk M., Berent J. Analiza genetyczna szczątków ludzkich ekshumowanych podczas badań archeologicznych na terenie byłego poligonu na Brusie w Łodzi. *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii*. 2013, 63, 99-108
16. DNA Working Group of the European Network of Forensic Science Institutes. Recommended Minimum Criteria for the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process, 2010, www.enfsi.eu
17. Drabik J. Międzynarodowa wymiana danych genetycznych - rekomendacje ENFSI w sprawie rozszerzenia Europejskiego Standardowego Zestawu Loci. *Problemy Kryminalistyki*. 2009, 265, 45-47
18. Edwards A., Civitello A., Hammond H.A., Caskey C.T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *The American Journal of Human Genetics*. 1991, 49, 746-756
19. Grgicak C.M., Urban Z.M., Cotton R.W. Investigation of reproducibility and error associated with qPCR methods using Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit. *Journal of Forensic Science*. 2010, 5, 1331-1339
20. Heid Ch.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. Real Time Quantitative PCR. *Genome Research*. 1996, 6, 986-994
21. Horsman K.M., Hickey J.A., Cotton R.W., Landers J.P., Maddox L.O. Development of Human - specific real - time PCR assay for simultaneous quantitation of total genomic and male DNA. *Journal of Forensic Science*. 2006, 51, 758-765

22. Hu N., Cong B., Li Sh., Ma Ch., Fu L., Zhang X. Current developments in forensic interpretation of mixed DNA samples (review). *Biomedical Reports*. 2014, 2, 309-316
23. Hu Q., Liu Y., Yi S., Huang D. A comparison of four methods for PCR inhibitor removal. *Forensic Science International: Genetics*. 2015, 16, 94-97
24. Hudlow W.R., Chong M.D., Swango K.L., Timken M.D., Buoncristiani M.R. A quadruplex real-time PCR assay for the simultaneous assessment of total human DNA, human male DNA, DNA degradation and the presence of the PCR inhibitors in forensic samples: A diagnostic tool for STR typing. *Forensic Science International: Genetics*. 2008, 2, 108-125
25. Invitrogen. Qubit® Fluorometer. Instruction manual. USA, 2007, O-070233-r4 US 101507
26. Jacewicz R. Badanie polimorfizmu DNA u osób po allogenicznym przeszczepie komórek macierzystych hematopoezy w aspekcie jego konsekwencji dla analiz z zakresu genetyki sądowej. Pracownia Genetyki Sądowej Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Rozprawa habilitacyjna, Łódź 2009
27. Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. Individual – specific “fingerprints” of human DNA. *Nature*. 1985, 316, 76-79
28. Kontanis E.J., Reed F.A. Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors. *Journal of Forensic Science*. 2006, 51, 795-804
29. Krenke B.E., Nassif N., Sprecher C.J. Knox C., Schwandt M. Developmental validation of a real - time PCR assay for the simultaneous quantification of total human and male DNA. *Forensic Science International: Genetics*. 2008, 3, 14-21
30. LaSalle H.E., Duncan G., McCord B. An analysis of single and multi - copy methods for DNA quantitation by real - time polymerase chain reaction. *Forensic Science International: Genetics*. 2011, 5, 185-193
31. Lee S.B., McCord B., Buel E. Advances in forensic DNA quantification: A review. *Electrophoresis*. 2014, 35, 3044-3052
32. Liu J.Y. Direct qPCR quantification of unprocessed forensic casework samples. *Forensic Science International: Genetics*. 2014, 11, 94-104

33. Liu J.Y. Direct qPCR quantification using the Quantifiler® Trio DNA Quantification kit. *Forensic Science International: Genetics*. 2014, 13, 10-19
34. Michalski R. Akredytacja laboratoriów wg normy PN - EN ISO/ IEC 17025 w pigułce. *Lab Laboratoria, Aparatura, Badania*. 2011, 3, 32-35
35. Michalski R., Mytych J. Przewodnik po akredytacji laboratoriów badawczych według normy PN-EN ISO/IEC 17025. Katowice 2011, Wydawnictwo Elamed
36. Mirowska A., Pawłowski R. Human nuclear and male Y - chromosome DNA quantification by real - time PCR assay. *Problems of Forensic Science*. 2008, 76, 355-368
37. Mullis K.B. Faloona F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 1987, 155, 335-350
38. Namieśnik J. Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych. Warszawa 2007, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne
39. National DNA Database Strategy Board. Annual Report 2013-14, 2014, www.gov.uk
40. Nicklas J.A. Buel E. Quantification of DNA in forensic samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2003, 376, 1160-1167
41. Nielsen K., Mogensen H.S., Hedman J., Niederstätter H., Parson W., Morling N. Comparison of five DNA quantification methods. *Forensic Science International: Genetics*. 2008, 2, 226-230
42. Oficjalna strona Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego Policji (CLKP): www.clk.policja.pl
43. Oficjalna strona Federalnego Biura Śledczego (FBI): www.fbi.gov
44. Opel K.L., Chung D., McCord B.R. A study of PCR inhibition mechanisms using real - time PCR. *Journal of Forensic Science*. 2010, 55, 25-33
45. Pawlak M. Badania identyfikacyjne. Pracownia Genetyki Sądowej Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Praca licencjacka, Łódź 2012

46. Petricevic S., Whitaker J., Buckleton J., Vintiner S., Patel J., Simon P., Ferraby H., Hermiz W., Russell A. Validation and development of interpretation guidelines for low copy number (LCN) DNA profiling in New Zealand using the AMPF ℓ STR \circledR SGM Plus TM multiplex. *Forensic Science International: Genetics*. 2010, 4, 305-310
47. Pionzio A.M., McCord B.R. The effect of internal control sequence and length on the response to PCR inhibition in real-time PCR quantitation. *Forensic Science International: Genetics*. 2014, 9, 55-60
48. Ruitberg Ch.M., Reeder D.J., Butler J.M. STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Research*. 2001, 29, 320-322
49. Saad R. Discovery, development, and current applications of DNA identity testing. *Baylor University Medical Center Proceedings*. 2005, 18, 130-133
50. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods. Validation Guidelines for DNA Analysis Methods, 2012, www.swagdam.org
51. Spas A., Zbieć-Piekarska R. Wewnętrzna walidacja metody kwantyfikacji DNA z wykorzystaniem zestawu Quantifiler Human DNA Quantification Kit i aparatu 7500 Real - Time PCR System wraz z oprogramowaniem Hid Real - Time PCR Analysis Software v1.1 w Zakładzie Biologii Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego Policji. *Problemy Kryminalistyki*. 2014, 284, 1-11
52. Spólnicka M., Zbieć - Piekarska R. Proces walidacji w kryminalistycznych badaniach profilowania DNA. *Problemy Kryminalistyki*. 2008, 262, 5-13
53. Swango K.L., Timken M.D., Chong M.D. Buoncritisini M.R. A quantitative PCR assay for the assessment of DNA degradation in forensic samples. *Forensic Science International*. 2006, 158, 14-26
54. Tarnicka M. Badanie ojcostwa. Pracownia Genetyki Sądowej Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Praca licencjacka, Łódź 2010
55. Tyburski J., Studzińska A., Daca P., Tretyn A. PCR w czasie rzeczywistym. *Metody analizy danych. Biotechnologia*. 2008, 1, 86-96

56. Vallone P.M., Hill C.R., Butler J.M. Demonstration of rapid multiplex amplification involving 16 genetic loci. *Forensic Science International: Genetics*. 2008, 3, 42-45
57. van Oorschot R.A.H., Ballantyne K.N., Mitchell R.J. Forensic trace DNA: a review. *Investigative Genetics*. 2010, 1, 14
58. Whitaker J.P., Cotton E.A., Gill P. A comparison of the characteristics of profiles produced with the AMPF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ SGM Plus TM multiplex system for both standard and low copy number (LCN) STR DNA analysis. *Forensic Science International*. 2001, 123, 215-223
59. Zeliaś A. *Metody statystyczne*. Warszawa 2002, Polskie Wydawnictwo Ekonomiczne.
60. Ziętkiewicz E., Witt M., Dąca P., Żebracka - Gala J., Goniewicz M., Jarzab B., Witt M. Current genetic methodologies in the identification of disaster victims and in forensic analysis. *Journal of Applied Genetics*. 2012, 53, 41-60

IX. Spis rycin

- Rycina 1. Etapy genetyczno – sądowej analizy materiału prowadzącej do uzyskania specyficznego osobniczo profilu DNA., s. 7
- Rycina 2. Znaczniki fluorescencyjne VIC, FAM, NED wykorzystane do znakowania sond wykrywających sekwencje RPPH1, SRY, IPC, użyte w zestawie Quantifiler Duo., s. 13
- Rycina 3. Schemat reakcji real – time PCR z wykorzystaniem sondy TaqMan w., s. 14
- Rycina 4. Aparat 7500 Real-Time PCR System z oprogramowaniem HD Real-Time PCR Analysis Software v1.1 (Pracownia Genetyki Medycznej i Sądowej Katedry i ZMS UM w Łodzi), s. 21
- Rycina 5. Krzywe reakcji amplifikacji sekwencji autosomalnej DNA (Duo Human) dla standardu z zestawu Quantifiler Duo o stężeniu 200 ng/μl i serii jego kolejnych rozcieńczeń: 100; 50; 5; 0,5; 0,05; 0,005 ng/μl (Załącznik nr 1), s. 27
- Rycina 6. Krzywe reakcji amplifikacji sekwencji chromosomu Y (Duo Male) dla standardu z zestawu Quantifiler Duo o stężeniu 200 ng/μl i serii jego kolejnych rozcieńczeń: 100; 50; 5; 0,5; 0,05; 0,005 ng/μl (Załącznik nr 1), s. 28
- Rycina 7. Krzywa standardowa zależności wartości cyklu C_t Duo Human i cyklu C_t Duo Male względem stężenia DNA wyrażona w skali liniowej., s. 29
- Rycina 8. Krzywa standardowa zależności wartości cyklu C_t Duo Human i cyklu C_t Duo Male względem stężenia DNA wyrażona w skali logarytmicznej., s. 30
- Rycina 9. Wykres reakcji amplifikacji wskaźnika inhibicji (IPC) dla rozcieńczeń standardu w zakresie stężeń 0,005 ng/ μl – 200 ng/μl., s. 31
- Rycina 10. Wykres zależności C_t wskaźnika inhibicji (IPC) od oznaczonego stężenia w badanych próbach z widoczną tendencją wzrostową cyklu C_t dla wysokich stężeń (zakres akceptowalny $C_t = 28 - 31$), s. 32
- Rycina 11. Wykres reakcji amplifikacji dla próby 7.18, dla której odnotowano najwyższe stężenie ludzkiego DNA oraz męskiego DNA., s. 35

- Rycina 12. Wykres reakcji amplifikacji dla próby P74 K15, dla której odnotowano najniższy próg detekcji męskiego DNA występującego w mieszaninie z żeńskim i towarzyszący mu efekt stochastyczny., s. 36
- Rycina 13. Porównanie wyników pomiaru stężeń DNA – metodą real – time PCR (Quantifiler DuoDNAQuantificationKit) oraz fluorymetryczną (Quant – iT HS dsDNA Kit), s. 39
- Rycina 14. Porównanie wyników pomiaru stężeń DNA – metodą real – time PCR (Quantifiler DuoDNAQuantificationKit) oraz fluorymetryczną (Quant – iT HS dsDNA Kit), s. 40
- Rycina 15. Zestawienie średnich wysokości sygnału (RFU) z ilością DNA użytą do reakcji PCR., s. 41
- Rycina 16. Wykres zależności średnich wysokości alleli (poziom RFU) od ilości DNA oraz liczby komórek, które poddano reakcji amplifikacji., s. 42

X. Spis tabel

Tabela 1. Charakterystyka sekwencji genomu ludzkiego, dla których zaprojektowane zostały sondy TaqMan w zestawie Quantifiler Duo., s. 13

Tabela 2. Składowe mieszaniny reakcyjnej z wykorzystaniem zestawu Quantifiler Duo DNA Quantification Kit., s. 20

Tabela 3. Rozcieńczenia materiałów kontrolnych poddanych reakcji multipleks PCR i rozdzielowi elektroforetycznemu., s. 26

Tabela 4. Ocena powtarzalności metody pomiaru stężenia DNA z wykorzystaniem zestawu Quantifiler Duo DNA Quantification Kit., s. 33

Tabela 5. Analiza odtwarzalności wyników metodami statystycznymi., s. 34

Tabela 6. Analiza statystyczna porównująca uzyskane pomiary stężeń prób kontrolnych z ich stężeniami DNA podanymi przez producenta., s. 37

XI. Wykaz skrótów wykorzystanych w pracy

CCD	<i>(ang. Charge Coupled Device)</i> – kamera CCD
CODIS	<i>(ang. Combined DNA Index System)</i> – system CODIS
C_t	<i>(ang. treshold cycle)</i> – cykl progowy
CV	<i>(ang. Coeficient of Variation)</i> – współczynnik zmienności
DH	<i>(ang. Duo Human DNA)</i> – analiza sekwencji autosomalnej
DM	<i>(ang. Duo Male DNA)</i> – analiza sekwencji chromosomu Y
DNA	<i>(ang. deoxyrybonucleic acid)</i> – kwas deoksyrybonukleinowy
DNA WG ENFSI	<i>(ang. DNA Working Group of the European Network of Forensic Science Institutes)</i> – Grupa Robocza ds. DNA Europejskiej Sieci Laboratoriów Nauk Sądowych
FBI	<i>(ang. Federal Bureau of Investigation)</i> – Federalne Biuro Śledcze
F_t	<i>(ang. Fluorescence treshold)</i> – próg fluorescencji
GEDNAP	<i>(ang. German DNA Profiling Group)</i> – Niemiecka Grupa ds. Profilowania DNA
ISO	<i>(ang. International Standards Organization)</i> – Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna
IPC	<i>(ang. Internal PCR Control)</i> – kontrola wewnętrzna/ wskaźnik inhibicji
ISFG	<i>(ang. International Society of Forensic Genetics)</i> – Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Sądowej
LCN DNA	<i>(ang. Low Copy Number DNA)</i> – niska liczba kopii DNA
LOL	<i>(ang. Limit of Linearity)</i> – limit liniowości
MDS	<i>(ang. Minimum Distinguishable Signal)</i> – minimalny sygnał różnicujący

mtDNA	<i>(ang. mitochondrial DNA)</i> – mitochondrialny DNA
PCR	<i>(ang. Polymerase Chain Reaction)</i> – łańcuchowa reakcja polimerazy
PTMSiK	Polskie Towarzystwo Medycyny Sądowej i Kryminologii
Q	<i>(ang. Quencher)</i> – wygaszacz
QR – PCR	<i>(ang. quantitative real – time PCR)</i> – ilościowa reakcja PCR
R	<i>(ang. Reporter)</i> – Reporter
R ²	<i>(ang. R² value)</i> – współczynnik determinacji
RFLP	<i>(ang. Restriction Fragments Length Polymorphism)</i> – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych
RFU	<i>(ang. Relative Fluorescence Unit)</i> – względna jednostka fluorescencji
ΔRn	<i>(ang. normalized reporter signal)</i> – znormalizowana wartość reportera
RPPH1	<i>(ang. Ribonuclease P RNA Component H1)</i> – komponenta H1 rybonukleazy P RNA
SNP	<i>(ang. Single Nucleotide Polymorphism)</i> – polimorfizm pojedynczych nukleotydów
SRY	<i>(ang. sex – determining region Y)</i> – region Y determinujący płeć
STR	<i>(ang. Short Tandem Repeats)</i> – krótkie sekwencje tandemowych powtórzeń
SD	<i>(ang. Standard Deviation)</i> – odchylenie standardowe
SWGDM	<i>(ang. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods)</i> – Naukowa Grupa Robocza ds. Analizy DNA
VNTR	<i>(ang. Variable Number of Tandem Repeats)</i> – zmienna liczba tandemowych powtórzeń

XII. Załączniki

Załącznik nr 1. Karta pomiarów standardu z zestawu Quantifiler Duo DNA Quantification Kit oraz jego rozcieńczeń.

Próba [ng/μl]	Zmienna	N	Średnie C _t	SD	CV [%]
200	Duo Human	8	22,50988	0,532142	2,364036
	Duo Male	8	22,86600	0,364581	1,594423
	Duo IPC	8	29,99438	0,391158	1,304103
200*	Duo Human	5	21,96140	0,546912	2,490333
	Duo Male	5	22,22960	0,565964	2,545993
	Duo IPC	5	30,02180	0,338484	1,127462
200**	Duo Human	5	21,57020	0,343750	1,593635
	Duo Male	5	21,94700	0,238986	1,088925
	Duo IPC	5	30,29900	0,285206	0,941305
100	Duo Human	4	23,04750	1,080459	4,687965
	Duo Male	4	23,40650	0,858216	3,666572
	Duo IPC	4	29,60950	0,184663	0,623660
50	Duo Human	3	24,50233	0,117534	0,479687
	Duo Male	3	25,11900	0,054809	0,218196
	Duo IPC	3	29,49100	0,079756	0,270441
5#	Duo Human	6	26,86250	0,112019	0,417010
	Duo Male	6	27,70050	0,133937	0,483518
	Duo IPC	6	29,40967	0,066132	0,224865
0,5	Duo Human	4	30,09200	0,149882	0,498080
	Duo Male	4	31,07200	0,266823	0,858726
	Duo IPC	4	29,35475	0,112604	0,383596
0,4	Duo Human	2	32,25050	0,006364	0,019733
	Duo Male	2	32,89550	0,164756	0,500846
	Duo IPC	2	29,49050	0,082731	0,280536
0,2	Duo Human	6	32,89200	0,435894	1,325227
	Duo Male	6	33,70033	0,575882	1,708832
	Duo IPC	6	29,38950	0,173909	0,591738
0,05#	Duo Human	6	33,35350	0,178688	0,535741
	Duo Male	6	34,38317	0,302395	0,879487
	Duo IPC	6	29,42983	0,083425	0,283472
0,04	Duo Human	2	35,84650	0,123744	0,345204
	Duo Male	2	36,79400	0,100409	0,272895
	Duo IPC	2	29,41450	0,009192	0,031251
0,02	Duo Human	5	35,52640	0,569490	1,603006
	Duo Male	5	37,07520	1,121054	3,023730
	Duo IPC	5	29,30600	0,137474	0,469097
0,005	Duo Human	3	37,19600	0,617350	1,659721
	Duo Male	3 [^]	37,39300	0,823072	2,201140
	Duo IPC	3	29,45533	0,080008	0,271626
0,004	Duo Human	2 [^]	37,07600	-	-
	Duo Male	2	-	-	-
	Duo IPC	2	29,41550	0,084146	0,286059

N – liczba pomiarów, SD – odchylenie standardowe, CV – współczynnik zmienności

Oznaczenia wykorzystane do sporządzenia krzywej standardowej zależności Ct względem stężenia

Analiza powtarzalności

* Analiza odtwarzalności (** drugi dzień pomiarowy)

[^] Brak detekcji DNA w jednym pomiarze, którego nie uwzględniono do obliczenia średniej

Załącznik nr 2. Karta pomiarów ludzkiego i męskiego DNA dla prób o charakterze dowodowym.

Próba	Stężenie Human DNA [ng/μl] (C _t)	Średnie stężenie [ng/μl]	Stężenie Male DNA [ng/μl] (C _t)	Średnie stężenie [ng/μl]	C _t IPC	M%
1.4	29,067 (24,423)	29,489	0,009 (36,933)	0,010	30,216	0,034
	29,911 (24,382)		0,011 (36,564)		29,803	
1.10	29,724 (24,391)	20,096	0,029 (35,148)	0,020	29,924	0,1
	10,469 (25,885)		0,012 (36,464)		30,643	
1.24	35,943 (24,119)	26,151	0,025 (35,395)	0,027	29,082	0,1
	16,358 (25,246)		0,029 (35,179)		29,808	
2.1	16,670 (25,219)	18,256	21,091 (25,535)	24,261	29,504	-
	19,534 (24,992)		27,605 (25,142)		29,524	
	18,563 (25,065)		24,088 (25,341)		29,690	
2.6	72,474 (23,115)	71,872	107,206 (23,161)	105,048	29,676	-
	71,270 (23,139)		102,890 (23,221)		29,956	
2.9	29,579 (24,398)	38,637	42,849 (24,500)	50,206	29,853	-
	47,695 (23,714)		57,563 (24,069)		29,316	
2.12	64,675 (23,278)	59,192	69,683 (23,790)	64,892	29,517	-
	53,709 (23,544)		60,101 (24,006)		29,398	
2.24	871,201 (19,555)	871,201	931,632 (20,004)	931,632	30,965	-
3.1	17,383 (25,159)	19,522	0,306 (31,716)	0,308	29,745	1,6
	21,662 (24,844)		0,311 (31,694)		29,607	
3.6	216,691 (21,547)	225,344	1,932 (29,025)	1,997	30,127	0,9
	233,997 (21,437)		2,062 (28,930)		30,885	
3.9	132,150 (22,255)	143,774	0,425 (31,236)	0,424	30,356	0,3
	155,398 (22,023)		0,422 (31,246)		30,022	
3.12	162,389 (21,960)	162,389	0,901 (30,139)	0,901	29,533	0,6
3.18	130,682 (22,271)	130,682	0,663 (30,586)	0,663	29,449	0,5
3.24	17,776 (25,127)	15,258	0,713 (30,481)	0,669	29,433	4,4
	12,739 (25,604)		0,626 (30,671)		29,271	
3.30	29,250 (24,414)	22,873	0,025 (35,373)	0,027	29,727	0,1
	16,496 (25,234)		0,028 (35,199)		30,014	
4.1	9,123 (26,082)	9,104	11,209 (26,458)	10,620	29,306	-
	9,085 (26,088)		10,032 (26,620)		29,250	
4.3	7,518 (26,359)	6,324	8,808 (26,810)	7,968	29,210	-
	5,131 (26,906)		7,128 (27,119)		29,310	
4.6	5,916 (26,702)	9,762	8,718 (26,825)	10,708	29,408	-
	15,106 (25,360)		16,618 (25,883)		29,326	
	5,883 (26,710)		8,321 (26,893)		29,772	
	12,140 (25,673)		9,177 (26,750)		29,719	
4.12	76,319 (23,041)	76,319	83,665 (23,523)	83,665	29,499	-
6.8	339,544 (20,904)	339,544	-	-	29,288	-
6.8 10x	28,148 (24,469)	28,148	-	-	29,088	-
6.8 100x	2,447 (27,966)	2,447	-	-	29,069	-

Najwyższe wartości stężenia DNA
 Najniższe wartości stężenia DNA
 Najwyższe wartości wskaźnika IPC
 Najniższe odsetki męskiego DNA w mieszaninie [M%]

Załącznik nr 2. Karta pomiarów ludzkiego i męskiego DNA dla prób o charakterze dowodowym cd.

Próba	Stężenie Human DNA [ng/μl] (C _t)	Średnie stężenie [ng/μl]	Stężenie Male DNA [ng/μl] (C _t)	Średnie stężenie [ng/μl]	C _t IPC	M%
6.8 1000x	0,178 (31,720)	0,178	-	-	29,094	-
6.12	42,831 (23,868)	42,831	-	-	29,183	-
7.3	2,566 (27,898)	2,566	2,644 (28,567)	2,644	29,120	-
7.6	203,773 (21,635)	200,620	258,307 (21,877)	247,629	29,778	-
	197,467 (21,680)		236,951 (22,003)		29,801	
7.12	150,484 (22,069)	150,484	158,620 (22,589)	158,620	29,567	-
7.18	1317,355(18,963)	1317,355	1322,924(19,492)	1322,924	30,618	-
10.1	64,360 (23,285)	64,927	67,476 (23,837)	68,771	29,407	-
	65,494 (23,260)		70,066 (23,782)		29,626	
10.2	23,787 (24,710)	23,787	26,877 (25,181)	26,877	29,536	-
10.6	90,437 (22,798)	90,437	92,022 (23,384)	92,022	29,412	-
10.12	55,891 (23,487)	70,680	69,255 (23,799)	73,675	30,257	-
	83,574 (22,911)		87,056 (23,465)		29,972	
	72,576 (23,113)		64,715 (23,898)		29,700	
17.120	90,374 (22,799)	77,820	2,956 (28,404)	2,760	30,568	3,6
	65,265 (23,265)		2,564 (28,612)		30,154	
17.120 10x	8,175 (26,239)	8,175	0,282 (31,834)	0,282	29,230	3,5
P1415	18,772 (25,049)	20,007	-	-	30,327	-
	21,242 (24,872)		-		30,030	
P74K15	278,059 (21,190)	225,134	0,004 (38,227)	0,004	29,634	0,002
	213,834 (21,566)		0,003 (38,330)		30,330	
	208,816 (21,600)		-		29,960	
	199,826 (21,663)		-		29,722	
P74K15 10x	20,200 (24,944)	19,772	-	-	29,271	-
	19,344 (25,006)		-		29,279	
P74K15 100x	9,022 (26,098)	5,263	-	-	29,034	-
	1,505 (28,662)		-		29,081	
P74K15 1000x	0,165 (31,828)	0,165	-	-	29,083	-
7 p	1,024 (29,213)	0,983	1,182 (29,742)	1,133	29,126	-
	0,942 (29,332)		1,084 (29,869)		29,249	
8 dz	0,171 (31,773)	0,174	-	-	30,382	-
	0,176 (31,735)		-		30,413	
9 m	1,289 (28,884)	1,479	-	-	29,106	-
	1,669 (28,514)		-		29,120	
10 p	1,238 (28,941)	1,124	1,328 (29,572)	1,296	28,975	-
	1,011 (29,232)		1,264 (29,644)		29,046	
11 dz	1,007 (29,237)	0,972	1,159 (29,771)	1,099	29,071	-
	0,937 (29,341)		1,038 (29,932)		29,099	
12 m	1,129 (29,073)	0,832	-	-	29,606	-
	0,535 (30,143)		-		29,819	

 Najwyższe wartości stężenia DNA

 Najniższe wartości stężenia DNA

 Najwyższe wartości wskaźnika IPC

 Najniższe odsetki męskiego DNA w mieszaninie [M%]

Załącznik nr 3. Karta pomiarów materiałów kontrolnych w procedurze walidacyjnej Quantifiler Duo DNA Quantification Kit.

Kontrola	Stężenie Human DNA [ng/μl] (C _t)	Średnie stężenie [ng/μl]	Stężenie Male DNA [ng/μl] (C _t)	Średnie stężenie [ng/μl]
K1 XY 0,1 ng/μl	0,121 (32,269)	0,096	0,117 (33,119)	0,102
	0,085 (32,775)		0,081 (33,659)	
	0,075 (32,959)		0,101 (33,337)	
	0,080 (32,870)		0,118 (33,108)	
	0,076 (32,936)		0,068 (33,903)	
	0,137 (32,092)		0,126 (33,012)	
K2 XY 2 ng/μl	0,871 (29,445)	0,997	1,007 (29,977)	1,126
	0,989 (29,263)		0,948 (30,064)	
	0,604 (29,969)		0,836 (30,249)	
	1,257 (28,920)		1,458 (29,436)	
	1,588 (28,585)		1,631 (29,272)	
	0,674 (29,811)		0,878 (30,177)	
K3 XY 2 ng/μl	1,308 (28,863)	1,652	29,563 (1,337)	1,615
	1,740 (28,454)		29,160 (1,761)	
	1,822 (28,388)		29,100 (1,835)	
	1,738 (28,456)		29,370 (1,525)	
K4 XY 0,1 ng/μl	0,059 (33,299)	0,068	0,039 (34,708)	0,077
	0,079 (32,887)		0,090 (33,498)	
	0,073 (32,994)		0,094 (33,437)	
	0,062 (33,229)		0,085 (33,590)	
K5 XX 0,1 ng/μl	0,103 (32,499)	0,091	-	-
	0,099 (32,554)		-	-
	0,101 (32,534)		-	-
	0,090 (32,697)		-	-
	0,070 (33,052)		-	-
	0,082 (32,820)		-	-
K6 XX 10 ng/μl	15,159 (25,355)	10,614	-	-
	6,371 (26,596)		-	-
	12,328 (25,651)		-	-
	8,597 (26,167)		-	-
K7 XX 0,1 ng/μl	0,064 (33,192)	0,089	-	-
	0,123 (32,245)		-	-
	0,108 (32,440)		-	-
	0,060 (33,274)		-	-

Załącznik nr 4. Karta pomiarów do oceny zależności średniej wartości RFU względem wsadowej ilości DNA do reakcji PCR.

Ilość DNA w 1 μ l [ng]	Ilość DNA w reakcji PCR [ng]	Średnia wartość RFU wysokości pików
2	6	19851,84
1	3	18156,36
0,2	0,6	8106,484
0,1	0,3	6525,427
0,05	0,15	4546,289
0,033	0,1	2953,664
0,02	0,06	2008,297
0,01	0,03	993,6719
0,005	0,015	581,3462

O Ś W I A D C Z E N I E

Ja niżej podpisana

Agnieszka Sobczak

studentka Wydziału Farmaceutycznego

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

oświadczam, że przedkładaną pracę magisterską pt.

„Walidacja systemu Quantifiler Duo do oznaczania amplifikowalnego specyficznego ludzkiego DNA w próbach genetyczno – sądowych.”

przygotowaną pod kierunkiem dr hab. n. med. Renaty Jacewicz

napisałam samodzielnie.

Oznacza to, że przy pisaniu pracy, poza niezbędnymi konsultacjami, nie korzystałam/am z pomocy innych osób, a w szczególności nie zlecałam/am opracowania rozprawy lub jej istotnych części innym osobom, ani też nie odpisywałam/am tej rozprawy lub jej istotnych części od innych osób.

Pracę opracowano zgodnie z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (t.j. Dz.U. 2006 nr 90 poz. 631 ze zm.)

Jednocześnie przyjmuję do wiadomości, że gdyby powyższe oświadczenie okazało się nieprawdziwe, decyzja o wydaniu mi dyplomu zostanie cofnięta.

Łódź, dnia 18.07.2015

.....

Podpis magistranta